

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



TESIS DOCTORAL

**Biosensores electroquímicos basados en nanomateriales para
el análisis de alimentos**

**Nanomaterials-based electrochemical biosensors for food
analysis**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Boryanka Petrova Borisova

Directores

Reynaldo Villalonga Santana
Alfredo Sánchez Sánchez
José Manuel Pingarrón Carrazón

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN
NANOMATERIALES PARA EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS**

**NANOMATERIALS-BASED ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS
FOR FOOD ANALYSIS**

Directores:

Dr. Reynaldo Villalonga Santana

Dr. Alfredo Sánchez Sánchez

Dr. José Manuel Pingarrón Carrazón

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

BORYANKA PETROVA BORISOVA

Madrid, 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN NANOMATERIALES PARA EL
ANÁLISIS DE ALIMENTOS
NANOMATERIALS-BASED ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS FOR FOOD
ANALYSIS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

BORYANKA PETROVA BORISOVA

DIRECTOR

REYNALDO VILLALONGA SANTANA
ALFREDO SÁNCHEZ SÁNCHEZ
JOSÉ MANUEL PINGARRÓN CARRAZÓN

© BORYANKA PETROVA BORISOVA



Tfno.: 91.394.43.31
Fax.: 91.394.43.29
E-mail: depquian@quim.ucm.es

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
28040 MADRID

D. **Reynaldo Villalonga Santana**, Catedrático de Universidad del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid.

D. **Alfredo Sánchez Sánchez**, Profesor Ayudante Doctor del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid.

D. **José Manuel Pingarrón Carrazón**, Catedrático de Universidad del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid.

HACEN CONSTAR,

Que el trabajo titulado ***“BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN NANOMATERIALES PARA ANÁLISIS DE ALIMENTOS”*** (NANOMATERIALS-BASED ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS FOR FOOD ANALYSIS) ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, constituyendo la Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, noviembre de 2019

Fdo. Reynaldo Villalonga Santana

Fdo. Alfredo Sánchez Sánchez

Fdo. José M. Pingarrón Carrazón

Fdo. Boryanka Petrova Borisova



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Boryanka Petrova Borisova,
estudiante en el Programa de Doctorado RD 99/2011 (D9BL) QUÍMICA AVANZADA,
de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN NANOMATERIALES PARA EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS
NANOMATERIAL BASED ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS FOR FOOD ANALYSIS

y dirigida por: Dr. Reynaldo Villalonga Santana,
Dr. Alfredo Sánchez Sánchez y
Dr. José Manuel Pingarrón Carrazón

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 18 de noviembre de 2019

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

AGRADECIMIENTOS

He visto que muchos estudiantes de doctorado que he conocido describen este período como escalar una montaña. En mi caso, lo percibo como un baño en un océano profundo sin ningún fondo que se pueda tocar. Probablemente, este es el llamado Océano del Conocimiento, descrito en los libros antiguos, donde el maestro y su guía son las piedras angulares de un estudiante en este proceso.

Debo reconocer especialmente a los directores de esta tesis doctoral: a los Profesores. Dr. Reynaldo Villalonga, Dr. Alfredo Sánchez y Dr. José M. Pingarrón por darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral y por confiar en mí. Es una rara oportunidad tener una excelente supervisión, apoyo, tolerancia, ayuda y conocimiento. En cada momento de dudas y debilidad durante este período, me corrigieron todo el tiempo que lo necesitaba, me explicaron todo con gran paciencia y me ataron a este camino profundo cada vez que lo necesitaba. Pido disculpas por mi ritmo de trabajo que no siempre fue el correcto.

También tengo que expresar mi gran agradecimiento a muchos profesores del departamento de Química Analítica en el FCQ como los Profesores. Dra. Paloma Yáñez-Sedeño, Dra. Concha Parrado, Dra. Araceli Gonzalez, Dra. M. Paloma Martínez, Dr. Julio Reviejo, Dra. Maria Pedrero. Dra. Lourdes Agüí, y. Dra. Susana Campuzano. Todos ellos me han brindado mucho apoyo, consejos y atención, y han sido tolerantes conmigo durante estos años.

Tengo que expresar un agradecimiento especial a la Profesora. Dra. Maria L. Villalonga, del Centro de Tecnología de Enzimas, Universidad de Matanzas - Cuba por la oportunidad de trabajar juntas y por todas las instrucciones, consejos y amabilidad recibidos por su parte.

A continuación, deseo agradecer de todo corazón a todos mis jóvenes colegas que conocí aquí, por su apoyo, atención, tiempo, consejos y aliento todos los días por tolerar mis quejas durante este período: Paula, Sandra, Paul, Ani, Bea, Ana, Vero, Gonzalo, Iñigo, Abdu, Rebe, Víctor, Eloy, Irene, Eva, Esther y Sara. Les deseo eterno éxito en todo lo que emprendan.

Tengo que expresar un agradecimiento muy especial al Prof. Dr. Dimitar Stavrev, del Departamento de Ciencia de Materiales de la Universidad Técnica de Varna, Bulgaria, por su confianza y apoyo, por su gran profesionalismo y amabilidad.

Otra gratitud especial a Lorenzo Alonso Arquitectos S.L, Madrid y personalmente a mi gran amigo Lorenzo por el apoyo, la ayuda, la confianza y por toda la inspiración y el aliento recibidos durante este tiempo.

Finalmente, necesito expresar mi amor y gratitud a cada maestro que he conocido en mi vida y que me enseñaron en la escuela y en las universidades a las que había asistido, tanto en mi propio país, Bulgaria como en España. Todos ustedes, las mejores personas, siempre han sido una fuente eterna de inspiración para mí.

**“CUANDO TE ESFUERZAS POR LA PERFECCIÓN, TE DAS CUENTA
DE QUE ES UNA MISIÓN EN MOVIMIENTO”**

Código de El BUSHIDO

Índice

1. Índice de figuras, tablas y esquemas	1
2. Abreviaturas y símbolos	13
3. Summary.	17
4. Resumen	23
5. Introducción	29
5.1. Análisis de alimentos	31
5.2. Biosensores electroquímicos	35
A) Clasificación basada en el mecanismo de biorreconocimiento	36
B) Clasificación basada en la técnica electroanalítica	36
5.2.1. Nanomateriales como elementos de transducción para biosensores electroquímicos	38
5.2.1.1. Nanomateriales	38
5.2.1.2. Biosensores electroquímicos nanoestructurados	40
5.2.1.3. Biosensores electroquímicos basados en grafeno y óxido de grafeno	42
5.2.1.4. Biosensores electroquímicos basados en nanohíbridos de óxido de grafeno	48
5.2.2. Nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 en el diseño de biosensores electroquímicos	57
5.3. Biosensores electroquímicos para el análisis de alimentos	61
5.3.1. Biosensores enzimáticos para xantina	61
5.3.2. Biosensores enzimáticos para catecol	63
5.3.3. Biosensores electroquímicos para levaduras en vinos	66
6. Objetivos	69

7.Publicaciones científicas	73
7.1. A layer-by-layer biosensing architecture based on polyamidoamine dendrimer and carboxymethylcellulose-modified graphene oxide (Electroanalysis 27, 2015, 2131-2138).....	75
7.2. Reduced graphene oxide-carboxymethyl cellulose layered with platinum nanoparticles/PAMAM dendrimer/magnetic nanoparticles hybrids. application to the preparation of enzyme electrochemical biosensors (Sensors and Actuators B: Chemical 232, 2016, 84-90)	93
7.3. Disposable electrochemical immunosensor for <i>Brettanomyces Bruxellensis</i> based on nanogold-reduced graphene oxide hybrid nanomaterial (Analytical and Bioanalytical Chemistry 409, 2017, 5667-5674)	115
7.4. Disposable amperometric immunosensor for <i>Saccharomyces cerevisiae</i> based on carboxylated graphene oxide modified electrode (Analytical and Bioanalytical Chemistry 410, 2018, 7901–7907)	135
7.5. Disposable electrochemical biosensor for <i>Brettanomyces bruxellensis</i> and total yeast content in wine based on core-shell magnetic nanoparticles (Sensors and Actuators B: Chemical 279, 2019, 15-21).....	153
8. Discusión Integradora	179
8.1 Biosensores enzimáticos contruidos por capas basadas en nanomateriales híbridos	183
8.2. Biosensores de afinidad contruidos a partir de nanomateriales híbridos	194
9. Conclusiones	211
10. Referencias	215

1.

Índice de figuras, tablas y esquemas

5. INTRODUCCIÓN

FIGURAS

Figura 5.1. Tipos de componentes comúnmente determinados mediante análisis químico de alimentos	33
Figura 5.2. Representación esquemática de un biosensor electroquímico	35
Figura 5.3. Producción científica global en el tema de biosensores electroquímicos durante 2014-2018 (Web of Science). Línea: artículos totales. Barras: biosensores con nanomateriales y por ciento sobre el total de artículos	37
Figura 5.4. Clasificación de los nanomateriales	38
Figura 5.5. Producción científica global en el tema de nanomateriales durante 2008-2018 (Web of Science)	39
Figura 5.6. Aplicaciones de los nanomateriales en diferentes áreas [Tsuzuki, 2009]	40
Figura 5.7. Distribución porcentual de los trabajos publicados en el tema de biosensores electroquímicos basados en nanomateriales durante 2008-2018 y 2014-2018, en función del nanomaterial empleado (Web of Science)	42
Figura 5.8. Representación esquemática de la estructura del grafeno	43
Figura 5.9. Representación esquemática de la estructura del óxido de grafeno	46
Figura 5.10. Representación del método Hummers de obtención del óxido de grafeno	46
Figura 5.11. Estructura de la sal sódica de la CMC	53
Figura 5.12. Parámetros estructurales de una molécula de dendrímero	55
Figura 5.13. Estructura de un dendrímero de PAMAM G4 con núcleo de etilendiamina	56
Figura 5.14. Estructura del cristal cúbico centrado en las caras y disposición de los átomos en la magnetita Fe_3O_4 (tet: tetrahédrico, oct: octahédrico, eq: ecuatorial, ax: axial) [Friák et al., 2007]	58
Figura 5.15. Metabolismo de xantina a partir de guanina y adenosina-5-fosfato [Tymoczko et al., 2013]	61

Figura 5.16. Estructura monomérica de la xantina oxidasa, representando amarillo el cofactor de molibdopterina, en naranja los centros ferrosulfurados y en rojo la molécula de FAD	62
Figura 5.17. Estructura monomérica de la tirosinasa, representando en negro los átomos de cobre	64
Figura 5.18. Reacción de oxidación de catecol en presencia de tirosinasa	65

TABLAS

Tabla 5.1. Biosensores electroquímicos basados en electrodos modificados con grafeno	45
Tabla 5.2. Biosensores electroquímicos basados en electrodos modificados con óxido de grafeno	47
Tabla 5.3. Biosensores electroquímicos basados en electrodos modificados con nanohíbridos de óxido de grafeno y nanopartículas metálicas	51
Tabla 5.4. Biosensores electroquímicos basados en electrodos modificados con nanohíbridos de óxido de grafeno y polímeros	52
Tabla 5.5. Biosensores electroquímicos basados en electrodos modificados con CMC	54
Tabla 5.6. Biosensores electroquímicos basados en electrodos modificados con dendrímeros de PAMAM	56
Tabla 5.7. Biosensores electroquímicos basados en electrodos modificados con nanopartículas de Fe_3O_4	59
Tabla 5.8. Biosensores electroquímicos basados en el uso de nanopartículas de Fe_3O_4 como elementos de captura	60
Tabla 5.9. Biosensores electroquímicos enzimáticos para xantina	63
Tabla 5.10. Biosensores electroquímicos para catecol basados en la enzima tirosinasa	66
Tabla 5.11. Biosensores electroquímicos para <i>B. bruxellensis</i>	68
Tabla 5.12. Biosensores electroquímicos para <i>S. cerevisiae</i>	68

7. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

7.1. A layer-by-layer biosensing architecture based on polyamidoamine dendrimer and carboxymethylcellulose-modified graphene oxide (Electroanalysis 27, 2015, 2131-2138)

FIGURAS

- Figure 1.** Scheme displaying the steps involved in the preparation of the layer-by-layer ensemble of rGO-CMC, PAMAM and Tyr on GCE 81
- Figure 2.** Effect of the GO-CMC/PAMAM bilayer composition (**A**) and immobilized tyrosinase (**B**) on the amperometric response of the Tyr/PAMAM/CMC-GO/GCE toward catechol. $E_{app} = -200$ mV 82
- Figure 3.** Cyclic voltammograms obtained at a GCE before (**a**) and after sequential layering with rGO-CMC (**b**) and PAMAM (**c**), and further immobilization of Tyr (**d**), in 0.1 M KCl solution containing 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ / $K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1) 83
- Figure 4.** FE-SEM images of GO (**A**), rGO-CMC (**B**), PAMAM/rGO-CMC (**C**) and Tyr/PAMAM/rGO-CMC (**D**) 83
- Figure 5.** Cyclic voltammograms recorded at the Tyr/PAMAM/ GO-CMC/GCE in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.5 at scan rate of 50 mV/s before (**a**) and after addition of 450 nM (**b**), 900 nM (**c**) and 1.4 μ M (**d**) catechol 84
- Figure 6.** Effect of the applied potential (**A**) and working pH (**B**) on the amperometric response of the Tyr/PAMAM/GO-CMC/GCE toward catechol 85
- Figure 7.** Dynamic amperometric responses (**A**) and calibration curve (**B**) obtained with the Tyr/PAMAM/GO-CMC/GCE (**a**) and the PAMAM/GO-CMC/GCE (**b**) for different catechol concentrations. $E_{app} = -200$ mV, catechol stock solution = 2.0 μ M. Each point represents the mean \pm SD for 10 different electrodes 86
- Figure 8** Effect of the storage time at 4 $^{\circ}$ C on the relative amperometric response of the Tyr/PAMAM/GO-CMC/GCE toward 100 nM catechol. Each point represents the mean \pm SD for three different electrodes 88
- Figure 9.** Relationship between the analytical signal of the biosensor and the absorbance at 750 nm of catechol samples analyzed by the Folin-Ciocalteu colorimetric method 89

ESQUEMAS

- Scheme 1.** Mechanism for Tyr-catalyzed electrochemical detection of catechol 84

TABLAS

Table 1. Comparison of the analytical performance of the Tyr/PAMAM/GO-CMC/GCE with that of previously reported Tyr-based biosensors for catechol	87
---	----

7.2. Reduced graphene oxide-carboxymethyl cellulose layered with platinum nanoparticles/PAMAM dendrimer/magnetic nanoparticles hybrids. application to the preparation of enzyme electrochemical biosensors (Sensors and Actuators B: Chemical 232, 2016, 84-90)

FIGURAS

Figure 1. Schematic display of the preparation of the MNP-PAMAM-PtNP and the XO/MNP-PAMAM-PtNP/rGO-CMC/GCE enzyme electrode	100
Figure 2. Representative TEM images of poly(dopamine)-modified magnetic nanoparticles (A), MNP-PAMAM-PtNP (B , C) and MNP-PAMAM-tNP/rGO-CMC (D)	101
Figure 3. A) Nyquist plots of bare GCE (a), rGO-CMC/GCE (b), MNP-PAMAMPtNP/ rGO-CMC/GCE (c) and XO/MNP-PAMAM-PtNP/rGO-CMC/GCE (d) in unstirred 0.1 M KCl solution containing 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1). B) Effect of the electrode composition on the electron transfer resistance	102
Figure 4. Cyclic voltammetry recorded with the XO/MNP-PAMAM/rGO-CMC/GCE (A) and XO/MNP-PAMAM-PtNP/rGO-CMC/GCE (B) in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 8.0 in the absence (red curves) and the presence (blue curves) of 80 μ M xanthine. Scan rate: 50 mV/s	103
Figure 5. Amperometric responses (A) and calibration curve (B) recorded with the XO/MNP-PAMAM-PtNP/GO-CMC/GCE biosensor. $E_{app} = + 600$ mV, stirring condition: 300 rpm	104
Figure 1S. Representative FE-SEM images of rGO-CMC (A), MNP-PAMAM-PtNP/rGO-CMC (B) and XO/MNP-PAMAM-PtNP/rGO-CMC (C)	112
Figure 2S. Influence of the amount of rGO-CMC (A), MNP-PAMAM-PtNP (B), XO (C) and glutaraldehyde (D) on the amperometric signal provided by the enzyme electrode toward addition of 10 μ L of 10 mM xanthine in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 8.0. Working potential = + 600 mV	112
Figure 3S. Influence of the working potential (A) and pH (B) on the amperometric signal of the enzyme electrode toward addition of 10 μ L of 10 mM xanthine	113

TABLAS

Table 1. Comparison of the analytical performance of relevant amperometric enzyme biosensors for xanthine	105
Table 2. Effect of potential interfering compounds on the XO/PtNP-PAMAM-MNP/GO-CMC/GCE biosensor response	106
Table 3. Xanthine content in fish samples after 5 days of spoilage	107

7.3. Disposable electrochemical immunosensor for *Brettanomyces Bruxellensis* based on nanogold-reduced graphene oxide hybrid nanomaterial (Analytical and Bioanalytical Chemistry 409, 2017, 5667-5674)

FIGURAS

Figure. 1 Schematic display of the steps involved in the preparation (a) and performance (b) of the antibody-functionalized electrode	122
Figure. 2 Representative TEM (a) and FE-SEM (b) images of the Au-rGO hybrid nanomaterial	123
Figure 3. Effect of the amount of nanohybrid (a), incubated antibody (b), time of immobilization (c) and coating with 1% BSA (d) on the normalized amperometric signal of the electrode toward 10^3 CFU/ mL Brett. $E_{app} = -200$ mV, 100% relative current intensity = 460 nA	124
Figure 4 Impedance plane diagram ($-Z''$ versus Z') for the EIS measurements at a OHT-000 electrode before (a) and after coating with Au-rGO (b), modification with 3-mercaptopropionic acid (c) and immobilization of the anti-Brett antibody (d) in 0.1 M KCl solution containing 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1)	125
Figure 5 Influence of the time (A) and temperature (B) of incubation of the immunosensor with 10^3 CFU/mL Brett solution on the normalized amperometric signal recorded with the electrode. $E_{app} = -200$ mV, 100% relative current intensity = 460 nA.	126
Figure 6 Calibration curve obtained with the amperometric immunosensor toward Brett in buffered solution (A) and commercial red wine sample (B). $E_{app} = -200$ mV	127
Figure 7 Normalized electrochemical response of the immunosensor toward 10^5 CFU/mL <i>B. bruxellensis</i> (1), <i>S. cerevisiae</i> (2), thermally inactivated <i>S. cerevisiae</i> (3) and <i>P. pastoris</i> (4) in commercial and undiluted red wine samples	128

Figure 8 Effect of time of storage on the normalized electrochemical response of the immunosensor toward 10^3 CFU/mL Brett in commercial and undiluted red wine samples	129
Figure S1 ATR-FTIR analysis of Au-rGO/SPE before (a) and after (b) modification with 3-mercaptopropionic	134
7.4. Disposable amperometric immunosensor for <i>Saccharomyces cerevisiae</i> based on carboxylated graphene oxide modified electrode (Analytical and Bioanalytical Chemistry 410, 2018, 7901–7907)	

FIGURAS

Figure 1. Schematic display of the steps involved in the preparation and performance of the immunobiosensor for Sacch	142
Figure 2. Influence of the amount of antibody (A), time of antibody immobilization (B) and concentration of BSA (C) on the amperometric response of the electrode. $E_{app} = -200$ mV, Sacch concentration: 10^4 CFU/mL, measuring solution: 0.9 mM hydroquinone, 0.5 mM H_2O_2 in working buffer	143
Figure 3. Effect of the time (A) and temperature (B) of incubation with the yeast samples on the amperometric response of the electrode. $E_{app} = -200$ mV, Sacch concentration: 10^4 CFU/mL, measuring solution: 0.9 mM hydroquinone, 0.5 mM H_2O_2 in working buffer	144
Figure 4. Calibration curves obtained with the amperometric immunosensors toward Sacch in working buffer solution (empty circles) and commercial wine samples (filled circles). $E_{app} = -200$ mV, measuring solution: 0.9 mM hydroquinone, 0.5 mM H_2O_2 in working buffer	145
Figure 5. Effect of time of storage at 4 °C in dry conditions on the normalized amperometric response of the biosensor toward 10^4 CFU/mL Sacch. $E_{app} = -200$ mV, measuring solution: 0.9 mM hydroquinone, 0.5 mM H_2O_2 in working buffer	147
Figure 6. Normalized electrochemical response of the biosensor toward 10^4 CFU/mL Sacch (1), <i>Z. fermentati</i> (2), <i>H. uvarum</i> (3), <i>T. delbrueckii</i> (4) and a mixture of Sacch and the rest of yeast (5) in commercial and undiluted white wine samples. $E_{app} = -200$ mV, measuring solution: 0.9 mM hydroquinone, 0.5 mM H_2O_2 in working buffer.....	148

TABLAS

Table 1. Analytical properties of biosensors employed for Sacch determination	146
--	-----

7.5. Disposable electrochemical biosensor for *Brettanomyces bruxellensis* and total yeast content in wine based on core-shell magnetic nanoparticles (Sensors and Actuators B: Chemical 279, 2019, 15-21)

FIGURAS

Figure 1. Schematic display of the steps involved in the preparation and performance of the biosensor for Brett (Ab-B sensor)	161
Figure 2. TEM (A) and FE-SEM (B) images of core-shell Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ NanoCaptors	162
Figure 3. Effect of the amount of magnetic capturer (A), and time of incubation with the magnetic nanoparticles (B) and ConA-HRP conjugate (C) on the normalized amperometric signal of the biosensors for Brett (Ab-B, open circles) and total yeast content (ConA-Y, filled circles). E _{app} = -200 mV, yeast concentration: 10 ³ CFU/ml, measuring solution: 0.5 mM H ₂ O ₂ in measuring buffer solution	163
Figure 4. Calibration curves obtained with the amperometric biosensors toward Brett (A, Ab-B sensor) and Sacch (B, ConA-Y sensor) in working buffer solution (open circles) and commercial red wine sample (filled circles). E _{app} = -200 mV, measuring solution: 0.5 mM H ₂ O ₂ in measuring buffer solution	164
Figure 5 Normalized electrochemical response of the biosensors for Brett (A, Ab-B sensor) and Sacch (B, ConA-Y sensor) toward 10 ³ CFU/mL <i>B. bruxellensis</i> (1), <i>S. cerevisiae</i> (2), thermal inactivated <i>S. cerevisiae</i> (3) and <i>P. pastoris</i> (4) in commercial and undiluted red wine samples. E _{app} = - 200 mV, measuring solution: 0.5 mM H ₂ O ₂ in measuring buffer solution	167
Figure 6. Calibration curves obtained with the amperometric biosensors for total yeast content (ConA-Y) in commercial red wine sample, using a 50% Brett – 50% Sacch mixture as standard. E _{app} = -200 mV, measuring solution: 0.5 mM H ₂ O ₂ in measuring buffer solution	168
Figure 1A. Amperometric responses of the biosensor for different Brett concentrations in working buffer solution. E _{app} = -200 mV, measuring solution: 0.5 mM H ₂ O ₂ in measuring buffer solution. Brett concentration: (a) 10 CFU/mL, (b) 10 ² CFU/mL, (c) 10 ³ CFU/mL, (d) 10 ⁴ CFU/mL, (e) 10 ⁵ CFU/mL, and f) 10 ⁶ CFU/mL	174

TABLAS

Table 1S. Analytical properties of optical and electrochemical biosensors for <i>B. bruxellensis</i>	175
---	-----

Table 2S. Analytical properties of optical and electrochemical biosensors for total yeast detection	175
 8. DISCUSIÓN INTEGRADORA	
 <i>FIGURAS</i>	
Figura 8.1. Proceso de preparación del derivado híbrido rGO-CMC	184
Figure 8.2. Ensamblaje mediante estructura capa de los biosensores basados en rGO-CMC	184
Figura 8.3 Voltamperogramas cíclicos de los biosensores preparados sin (A) y con nanopartículas de platino (B) en presencia (curvas azules) y ausencia (curvas rojas) de xantina 80 µM en 0.1 M PBS, pH 8.0 con una velocidad de barrido de 50 mV/s	186
Figura 8.4 Caracterización del ensamblaje del biosensor Tyr/PAMAM/rGO-CMC/GCE mediante voltamperometría cíclica con $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 5 mM en KCl 100 mM. GCE (a), tras la incorporación del derivado rGO-CMC (b), con PAMAM (c), y tras la inmovilización de la enzima tirosinasa (d)	187
Figura 8.5 Diagramas de Nyquist de las distintas etapas de ensamblaje del biosensor. GCE (a), rGO-CMC/GCE (b), MNP-PAMAM-PtNP/rGO-CMC/GCE (c) y XO/MNP-PAMAM-PtNP/rGO-CMC/GCE (d) en $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 5 mM en KCl 100 mM	188
Figura 8.6 Imágenes de FE-SEM de electrodos de carbono vitrificado modificado con rGO-CMC y PAMAM G4 (A) y con rGO-CMC y MNP-PAMAM-PtNPs (B)	188
Figura 8.7 Representación esquemática del funcionamiento del biosensor enzimático basado en tirosinasa	190
Figura 8.8. Ensayo de selectividad del biosensor Tyr/PAMAM/rGO-CMC/GCE hacia ácido ascórbico, tirosina, ácido úrico, epinefrina, estriol y 17β-estradiol, frente a catecol, todos a una concentración de 100 nM ..	191
Figura 8.9 Efecto de la presencia de distintas especies (urea, glucosa, galactosa, cafeína, fructosa, ácido úrico, ácido ascórbico) en la señal amperométrica de xantina 10 µM	192
Figura 8.10 Ensamblaje tipo sándwich basado en el complejo ConA-HRP como elemento de marcaje y señalización, desarrollado sobre electrodos serigrafiados	195
Figura 8.11 Imágenes de los derivados de grafeno, (A) Au-rGO mediante TEM, (B) Au-rGO mediante SEM; (C) COOH-rGO mediante TEM y (D) COOH-rGO mediante SEM	196

Figura 8.12 Representación esquemática del ensamblaje de los inmunosensores desarrollados para la detección de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre electrodos serigrafiados de carbono	197
Figura 8.13 Etapas de la preparación del derivado Au-rGO	198
Figura 8.14 Espectros de ATR-FTIR del electrodo serigrafiado de carbono modificado con el derivado Au-rGO antes (a) y después (b) de modificarlo con el ácido 3-mercaptopropiónico	198
Figura 8.15. Efecto del uso de BSA (1 %) como agente de bloqueo sobre la señal amperométrica del inmunosensor aBAb/Au-rGO/SPE frente a 10^3 UFC/ mL Brett (A); y de distintas concentraciones de BSA en la señal amperométrica del inmonosensor aSAb/COOH-rGO/SPE frente a 10^4 UFC/ mL Sacch (B)	200
Figura 8.16. Respuesta del inmunosensor aBAb/Au-rGO/SPE frente a 10^5 UFC/mL de distintas levaduras (A); y del inmonosensor aSAb/COOH-rGO/SPE frente a 10^4 UFC/ mL de distintas levaduras (B) ..	203
Figura 8.17. Efecto del tiempo de almacenamiento a 4 °C en condiciones secas del inmunosensor aBAb/Au-rGO/SPE (A); y del inmonosensor aSAb/COOH-rGO/SPE (B)	203
Figura 8.18. Representación esquemática de la metodología empleada para la determinación de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> (A); y de levadura total (B)	205
Figura 8.19. Imagen TEM (A) y FE-SEM (B) de los NanoCaptors con estructura núcleo@corteza de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$	206
Figura 8.20 Curvas de calibrado del biosensor para Brett en disoluciones patrón (círculos blancos) y en muestras de vino tinto comercial (círculos rojos)	207
Figura 8. 21 Curvas de calibrado del biosensor para levaduras totales en disoluciones patrón (círculos blancos) y en muestras de vino tinto comercial (círculos azules)	208
Figura 8. 22 Respuesta electroquímica obtenida de los biosensores de Brett (A) y levaduras totales (B) frente a distintas levaduras a una concentración de 10^3 UFC/mL en vino tinto sin diluir	209

TABLAS

Tabla 8.1 Contenido en xantina en muestras de pescado tras 5 días de descomposición	193
--	-----

2.

***Abreviaturas y
Símbolos***

aBAb : Anticuerpo anti-Brett	ISO : Organización Internacional de Normalización
AFM : Microscopía de Fuerza Atómica	IUPAC : Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
aSAb : Anticuerpo anti-Sacch	K_M : Constante de Michaelis-Menten
APTES : 3-Aminopropil-trimetoxisilano	LBL : Capa por capa
ATR-FT-IR : Espectroscopia de Infrarrojo con transformada de Fourier mediante reflexión total atenuada	LD : Límite de detección
AuNP : Nanopartícula de oro	mRNA : Micro ácido ribonucleico
BSA : Albúmina de suero bovino	MWCNTs : Nanotubos de carbono de pared múltiple
Brett : <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	NADH : Nicotinamida Adenina Dinucleótido de Hidrógeno
CD : Ciclodextrina	NC : NanoCaptors
CFU (UFC) : Unidad formadora de colonias	NCR-80A : Nanocaptors funcionalizados con avidina
CMC : o-Carboximetilcelulosa	NCR-02A : Nanocaptors funcionalizados con 3-propil isocianato
CMCox : Carboximetilcelulosa oxidada	NHS : N-hidroxisuccinimida
CNTs : Nanotubos de carbono	NPs : Nanopartículas
ConA : Lectina concanavalina A	PAMAM : Dendrímero de poliamido-amina
CV : Voltamperometría Cíclica	PBS : Disolución reguladora de fosfato salino
ELISA : Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas	PCR : Reacción de la polimerasa en cadena
EDAC : 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida	rGO : Óxido de grafeno reducido
EIS : Espectroscopia de Impedancia Electroquímica	RSD : Desviación estándar relativa
FAD : Dinucleótido de Flavina y Adenina	Sacch : <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
FE-SEM : Microscopía Electrónica de Barrido con Emisión de Campo	SEM : Microscopía Electrónica de Barrido
FT-IR : Espectroscopia de Infrarrojo con transformada de Fourier	SPCE : Electrodo serigrafiados de carbono
GA : Glutaraldehído	SPE : Electrodo serigrafiados
GCE : Electrodo de carbono vitrificado	TEM : Microscopía de Transmisión Electrónica
GO : Óxido de grafeno	Tyr : Tirosinasa
GOx : Glucosa oxidasa	USD : dólar estadounidense
GO-CMC : Óxido de grafeno-Carboximetilcelulosa	WHO : Organización Mundial de la Salud
HPLC : Cromatografía líquida de alto rendimiento	XO : Xantina oxidasa
HRP : Peroxidasa de rábano picante	
HR-TEM : Microscopía de transmisión electrónica de alta resolución	

3.

Summary

Food analysis is a very important branch of Analytical Chemistry, able to provide information about chemical composition, processing, quality control and contamination of foodstuffs, ensuring safety and protection of public health, but also guaranteeing compliance with international and national standards and market regulations. Nowadays, food analysis is mainly performed at lab environments by using Analytical Chemistry and microbiological tests. However, these tests often take considerable time and expertise to execute, and cannot be replicated easily in the field.

In this context, electrochemical biosensors are promising alternatives to traditional methods for food analysis. These biosensors allow fast, sensitive, selective, simple and cost-effective determination of food components and contaminants at the place of sampling, by using portable instruments and miniaturized sensors. In addition, the analytical performance of these electrochemical devices can be significantly improved by using advanced nanomaterials as transduction, signaling or capturing elements.

This PhD dissertation, presented as a compendium of five published research articles, describes new approaches for the design of nanostructured electrochemical biosensors for food analysis. The main aim of this research was to prepare original hybrid nanomaterials for their use as transduction or capturing elements in novel electrochemical biosensors for food chemical composition and microbiological analysis.

The first paper (*Electroanalysis* 27 (2015) 2131-2138) describes the construction of a layered enzyme biosensor for catechol determination. It implied the electrostatic layer-by-layer assembly of four-generation ethylenediamine core polyamidoamine G-4 dendrimers on glassy carbon electrodes coated with a graphene oxide-carboxymethylcellulose hybrid nanomaterial. This modified surface was further employed for the covalent immobilization of the enzyme tyrosinase through a glutaraldehyde-mediated cross-linking. The prepared enzyme electrode allowed the amperometric detection of catechol in the 2 – 400 nM range. The biosensor showed excellent analytical performance with high sensitivity of 6.3 A/M and low detection limit of 0.9 nM. The enzyme electrode retained over 93 % of the initial activity after 40 days at 4 °C.

The second work (*Sensors and Actuators B: Chemical* 232 (2016) 84-90) reports the assembly of a novel enzyme biosensor with layer-by-layer architecture for the amperometric detection of xanthine. The nanostructured sensing interface was prepared with poly(dopamine)-modified magnetic nanoparticles which were covalently coated with four-generation ethylenediamine core polyamidoamine G-4 dendrimers and further decorated with platinum nanoparticles. This nanohybrid was fully characterized and further layered on glassy carbon electrodes coated with a graphene oxide-carboxymethylcellulose

hybrid nanomaterial through electrostatic interactions. The nanostructured surface was then employed as scaffold for the covalent immobilization of the enzyme xanthine oxidase through a glutaraldehyde-mediated cross-linking. The enzyme electrode allowed the amperometric detection of xanthine in the 50 nM – 12 μ M range, with a high sensitivity of 140 mA/M cm² and low detection limit of 13 nM. The biosensor exhibited high reproducibility and repeatability, and was successfully tested for the quantification of xanthine in fish samples.

The third article (*Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409 (2017) 5667-5674) reports a novel disposable amperometric immunosensor for the detection of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis* in red wine. The nanostructured sensing interface was prepared by first coating carbon screen printed electrodes with a gold nanoparticles-reduced graphene oxide hybrid nanomaterial, which was then modified with 3-mercaptopropionic acid to further immobilize specific antibodies for *B. bruxellensis* via a carbodiimide-coupling reaction. The functionalized electrode allowed the amperometric detection of *B. bruxellensis* in buffered solutions and red wine samples in the range of 10 – 10⁶ CFU/mL and 10² – 10⁶ CFU/mL, with low detection limits of 8 CFU/mL and 56 CFU/mL, respectively. The electrochemical immunosensor also exhibited high reproducibility, selectivity, and storage stability.

The fourth work (*Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410 (2018) 7901-7907) describes the construction of a sensitive and disposable electrochemical immunosensor for *Saccharomyces cerevisiae*. This device was constructed by using carbon screen-printed electrodes modified with propionic acid-functionalized graphene oxide as transduction element. The affinity-based biosensing interface was assembled by covalent immobilization of a specific polyclonal antibody on the carboxylate-enriched electrode surface via a water-soluble carbodiimide/N-hydroxysuccinimide coupling approach. A concanavalin A-peroxidase conjugate was further used as signaling element. The immunosensor allowed the amperometric detection of the yeast in buffer solution and white wine samples in the range of 10 - 10⁷ CFU/mL. This electroanalytical device also exhibited low detection limit and high selectivity, reproducibility, and storage stability. The immunosensor was successfully validated in spiked white wine samples.

The last paper (*Sensors and Actuators B: Chemical* 279 (2019) 15-21) reports the construction of two different and disposable amperometric biosensors for the rapid detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and total yeast content in wine. The biosensing approach implied the use of magnetic capturing elements based on core-shell Fe₃O₄@SiO₂ superparamagnetic nanoparticles functionalized with specific bioreceptors: Concanavalin A for total yeast analysis, and a polyclonal antibody for *B. bruxellensis*

determination. A Concanavalin A-peroxidase conjugate and carbon screen printed electrodes were used as signaling element and sensing interfaces, respectively. The biosensor based on antibody-modified magnetic nanoparticles allowed the amperometric detection of *B. bruxellensis* in buffer solution and red wine samples in the range of 10^{-10} - 10^6 CFU/mL, with low detection limits of 6 CFU/mL and 8 CFU/mL, respectively. In addition, the use of Concanavalin A-linked magnetic nanoparticles as capturing elements allowed determination of total yeast content in buffer solution and red wine in the range of 10^{-10} - 10^6 CFU/mL, with detection limit of 5 CFU/mL. These electrochemical biosensors also exhibited high reproducibility, selectivity and storage stability.

4.

Resumen

El análisis de alimentos es una rama muy importante de la Química Analítica, capaz de aportar información relativa a la composición química, procesamiento, control de calidad y contaminación de los productos alimentarios, garantizando la seguridad y protegiendo la salud pública, así como asegurando el cumplimiento de la normativa y las regulaciones del mercado nacional e internacional. Actualmente, el análisis de alimentos se realiza principalmente en laboratorios, mediante el empleo de ensayos de Química Analítica y microbiológicos. Sin embargo, estos ensayos requieren habitualmente un tiempo considerado y una amplia experiencia para realizarlos, y no se pueden reproducir de forma sencilla en análisis de campo.

En este contexto, los biosensores electroquímicos son una alternativa prometedora frente a métodos tradicionales para el análisis de alimentos. Estos biosensores permiten la determinación de los componentes y contaminantes de los alimentos en el lugar de muestreo, de una forma rápida, sensible, selectiva, simple y económica, mediante el uso de instrumentos portátiles y sensores miniaturizados. Asimismo, el rendimiento analítico de estos dispositivos electroquímicos puede ser mejorado notablemente mediante el empleo de nanomateriales avanzados como elementos de transducción, señalización o captura.

Esta tesis doctoral, presentada como compendio de cinco artículos de investigación, describe nuevas estrategias en el diseño de biosensores electroquímicos nanoestructurados para el análisis de alimentos. El principal objetivo de esta investigación consistió en la preparación de nanomateriales híbridos originales para su empleo como elementos de transducción o captura en novedosos biosensores electroquímicos para el análisis de composición química y microbiológica de alimentos.

El primer artículo (*Electroanalysis* 27 (2015) 2131-2138) describe la construcción de un biosensor enzimático por capas para la determinación de catecol. Esto supone el ensamblaje electrostático de capas del dendrímero de cuarta generación (G4) de poliamidoamina con núcleo de etilendiamina sobre electrodos de carbono vitrificado modificados con el nanohíbrido de óxido de grafeno-carboximetilcelulosa. Esta superficie modificada fue empleada posteriormente para la inmovilización covalente de la enzima tirosinasa a través de entrecruzamiento con glutaraldehído. El biosensor enzimático preparado permitió la detección amperométrica de catecol en el intervalo 2 - 400 nM. El biosensor mostró unas excelentes características analíticas incluyendo una alta sensibilidad de 6.3 A/M y un bajo límite de detección de 0.9 nM. El biosensor enzimático mantuvo más de un 93 % de su actividad inicial después de 40 días de almacenamiento a 4 °C.

El segundo trabajo (*Sensors and Actuators B: Chemical* 232 (2016) 84-90) muestra el ensamblaje de un novedoso biosensor enzimático con estructura de capas para la

detección amperométrica de xantina. La interfase sensora nanoestructurada se preparó usando nanopartículas magnéticas modificadas con polidopamina, las cuales se cubrieron covalentemente con dendrímero de cuarta generación (G4) de poliamidoamina con núcleo de etilendiamina que posteriormente se decoró con nanopartículas de platino. Este nanohíbrido se caracterizó y posteriormente se usó para modificar electrodos de carbono vitrificado, mediante interacciones electrostáticas, que habían sido recubiertos con el nanohíbrido de óxido de grafeno-carboximetilcelulosa. La superficie nanoestructurada se empleó entonces como soporte para la inmovilización covalente de la enzima xantina oxidasa mediante entrecruzamiento con glutaraldehído. El biosensor enzimático posibilitó la detección amperométrica de xantina en el intervalo 50 nM - 10 μ M, con una elevada sensibilidad de 140 mA/M \cdot cm² y un bajo límite de detección de 13 nM. El biosensor exhibió una elevada reproducibilidad y repetitividad, y fue evaluado satisfactoriamente en la cuantificación de xantina en muestras de pescado.

El tercer artículo (*Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409 (2017) 5667-5674) muestra un nuevo inmunosensor amperométrico desechable para la detección de la levadura contaminante *Brettanomyces bruxellensis* en vino tinto. La interfase sensora nanoestructurada se preparó mediante un primer recubrimiento de los electrodos serigrafiados de carbono con el nanomaterial híbrido de óxido de grafeno reducido-nanopartículas de oro, las cuales se modifican a continuación con el ácido 3-mercaptopropiónico para la posterior inmovilización de anticuerpos específicos de *B. bruxellensis* mediante ensamblaje con carbodiimida. El electrodo funcionalizado permitió la detección amperométrica de *B. bruxellensis* en disoluciones reguladoras y muestras de vino tinto en el intervalo de 10 - 10⁶ UFC/mL y 10² - 10⁶ UFC/mL, con bajos límites de detección de 8 UFC/mL y 56 UFC/mL, respectivamente. El inmunosensor electroquímico mostró además elevada reproducibilidad, selectividad y estabilidad de almacenamiento.

El cuarto trabajo (*Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410 (2018) 7901-7907) describe la construcción de un inmunosensor electroquímico para *Saccharomyces cerevisiae* sensible y desechable. Este dispositivo fue construido con electrodos serigrafiados de carbono modificados con óxido de grafeno funcionalizado con ácido propiónico como elemento de transducción. La interfase sensora de afinidad se ensambló mediante inmovilización covalente del anticuerpo policlonal específico a la superficie del electrodo enriquecida con grupos carboxilos via carbodiimida/N-hidroxisuccinimida. Posteriormente, se empleó un conjugado de concanavalina A-peroxidasa como elemento de señalización. El inmunosensor permitió la detección amperométrica de la levadura en disoluciones reguladoras y muestras de vino blanco en el intervalo 10 - 10⁷ UFC/mL. Este dispositivo electroquímico presentó además un bajo límite de detección y alta selectividad,

reproducibilidad y estabilidad de almacenamiento. El inmunosensor fue validado satisfactoriamente en muestras de vino blanco enriquecidas.

El último artículo (*Sensors and Actuators B: Chemical* 279 (2019) 15-21) recoge la construcción de dos biosensores amperométricos desechables para la rápida detección y cuantificación de *Brettanomyces bruxellensis* y levaduras totales en vino. El enfoque biosensor implica el uso de elementos de captura magnética basados en nanopartículas superparamagnéticas con estructura de núcleo-corteza de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ funcionalizadas con biorreceptores específicos: Concanavalina A para el análisis de levaduras totales, y anticuerpos policlonales para la determinación de *B. bruxellensis*. Se emplearon un conjugado de concanavalina A-peroxidasa y electrodos serigrafiados de carbono como elementos de señalización e interfase sensora, respectivamente. El biosensor basado en nanopartículas magnéticas modificadas con anticuerpos posibilitó la detección amperométrica de *B. bruxellensis* en disoluciones reguladoras y muestras de vino tinto en el intervalo $10 - 10^6$ UFC/mL, con un bajo límite de detección de 6 UFC/mL y 8 UFC/mL, respectivamente. Asimismo, el uso de concanavalina A unida a nanopartículas magnéticas como elementos de captura permitió la determinación del contenido de levaduras totales en disoluciones reguladoras y muestras de vino tinto en el intervalo $10 - 10^6$ UFC/mL, con límites de detección de 5 UFC/mL. Estos biosensores electroquímicos además mostraron alta reproducibilidad, selectividad y estabilidad de almacenamiento.

5.

Introducción

5.1. Análisis de alimentos

La producción de alimentos ha constituido la actividad económica más relevante y necesaria para el hombre durante toda su historia, la cual ha condicionado tanto la supervivencia como el desarrollo de la humanidad. En la actualidad esta industria se enfrenta a importantes retos, ya que debe producir más alimentos para una población mundial creciente, reduciendo los costes e impacto ambiental, adaptándose al cambio climático y asegurando la calidad nutricional y seguridad para la salud de los consumidores [Mehrabi et al., 2018; Prosekov & Ivanova, 2018]. En este contexto, el análisis de alimentos desempeña un rol fundamental como herramienta que garantiza la calidad e inocuidad de los productos alimenticios [Fennema et al., 2017; Abbas et al., 2018].

El análisis de alimentos es la disciplina que se ocupa del desarrollo, la aplicación y el estudio de procedimientos analíticos para caracterizar las propiedades de los alimentos y sus componentes [Nielsen, 2010]. Estos procedimientos analíticos se utilizan para proporcionar información sobre una amplia variedad de características diferentes de los alimentos, incluida su composición, estructura, propiedades físico-químicas, atributos sensoriales, y posible presencia de contaminantes químicos o microbiológicos. Esta información es fundamental para la comprensión racional de los factores que determinan las propiedades de los alimentos, así como para la capacidad de producir alimentos que sean seguros, nutritivos y deseables de manera consistente, y para que los consumidores tomen decisiones informadas sobre su dieta.

Un claro ejemplo que denota la importancia actual del análisis de los alimentos es el volumen de mercado que estos métodos representan. En este sentido, los métodos de análisis de contaminantes químicos y microbiológicos de alimentos representaron un mercado global de 14.23 billones de dólares estadounidenses (USD) en 2018, y se espera que mantenga una tasa de crecimiento anual compuesto de 7.6 % hasta 2023, donde debe alcanzar un valor total de 20.52 billones de USD [Market Data Forecast, 2018]. Asimismo, los métodos de análisis composicional y nutricional de alimentos representaron un mercado de 4.04 billones de USD en 2017, con una proyección de 8.2 % para su tasa de crecimiento anual compuesto hasta 2022, año para el cual se prevé alcance un valor de mercado global de 5.99 billones de USD [Research and Markets, 2017].

Los métodos de análisis de los alimentos pueden clasificarse en [Singham et al., 2015]:

- Métodos subjetivos: Aspecto del alimento, olor, gusto y sensaciones táctiles.

- Métodos objetivos: Propiedades físicas, químicas, microscópicas y microbiológicas.

El análisis microbiológico de los alimentos comprende la determinación de los microorganismos inocuos, beneficios y/o perniciosos contenidos en el producto durante cualquiera de las fases de producción, transporte y conservación antes del consumo [Castro-Ibáñez et al., 2017]. Estos análisis se realizan fundamentalmente mediante procedimientos tradicionales de cultivo, identificación y conteo celular [Feng, 1996]. Estos métodos presentan la ventaja de ser simples, poco costosos y muy específicos. Sin embargo, requieren largos tiempos de cultivo, lo cual les hace inapropiados para la rápida toma de decisiones durante la producción industrial.

Durante las últimas décadas, los métodos de identificación y cuantificación de microorganismos basados en técnicas inmunológicas (ELISA, citometría de flujo) o de biología molecular (fundamentalmente los que emplean la reacción en cadena de la polimerasa o PCR), se han ido introduciendo en los laboratorios de análisis de alimentos [Rasooly & Herold, 2008; Lo & Shaw, 2018; Wu, 2019; O'Meara & Wilkinson, 2019]. Aunque estos métodos son altamente sensibles, específicos y requieren menores tiempos de análisis que los métodos microbiológicos tradicionales, poseen como principal desventaja la necesidad de equipamiento especializado y costoso, así como de personal altamente cualificado para la realización de las determinaciones. Estas características limitan el amplio uso de estas técnicas en laboratorios de control de calidad en industrias pequeñas, por parte de productores individuales, o en países en vías de desarrollo donde el fortalecimiento de la seguridad alimentaria constituye una necesidad urgente.

Por otra parte, los métodos químicos de análisis de alimentos comprenden los procedimientos destinados a determinar los componentes nutritivos de los alimentos, los que afectan a su sabor y los considerados como contaminantes o impurezas. Como se representa en la **Figura 5.1**, estos componentes pueden ser de naturaleza intrínseca o exógena [Nielsen, 2010].



Figura 5.1. Tipos de componentes comúnmente determinados mediante análisis químico de alimentos

Los métodos químicos de análisis de alimentos pueden clasificarse en clásicos e instrumentales. Los métodos clásicos se emplean en la determinación del contenido de agua y humedad, cenizas, materia grasa, fibra, etc. Estos métodos se caracterizan por su simplicidad, fácil implementación y bajo coste, pero solo son aplicables a la determinación de macrocomponentes.

En cambio, los métodos instrumentales poseen una mayor variedad de usos en el análisis de alimentos, siendo efectivos tanto para el análisis de macro- y microcomponentes, como para la determinación de compuestos trazas. Los principales métodos instrumentales empleados en el análisis de alimentos pueden clasificarse en [Nielsen, 2010; Lehotay, 2018]:

- **Ópticos:** Se utilizan principalmente en la determinación de metales mediante espectroscopias de absorción y emisión atómicas, y la determinación de compuestos orgánicos mediante espectroscopias de absorción molecular y fluorescencia UV-visible.
- **Electroquímicos:** Su uso se centra en la determinación de iones mediante técnicas potenciométricas.
- **Cromatográficos:** La cromatografía de gases se emplea en la determinación de gases, aromas y otras sustancias volátiles. Asimismo, la cromatografía líquida de

alta eficacia se aplica en el análisis de sustancias orgánicas no volátiles como vitaminas, ácidos grasos, carbohidratos, aditivos, etc.

Estos métodos poseen una alta sensibilidad, reproducibilidad y bajos límites de detección, lo cual ha favorecido su amplia implementación en el análisis de alimentos. Sin embargo, el coste de los instrumentos, la complejidad de algunos procesos de pretratamiento de muestra, y la necesidad de personal cualificado son factores que limitan su mayor uso.

De la misma forma, debe destacarse que los citados métodos de análisis químico y microbiológico requieren el uso de laboratorios especializados, y no pueden ser empleados directamente en el lugar de toma de la muestra dentro de los entornos de la cadena de producción y distribución de alimentos. Por tales motivos, el desarrollo de nuevos métodos de análisis altamente sensibles y específicos, basados en instrumentos portátiles y miniaturizados, de bajo coste y uso simple, y que no requieran de complejos protocolos de tratamiento de muestra ni especialización del personal encargado de realizar las determinaciones, es una prioridad dentro de la industria de los alimentos [Rotariu et al., 2016; Yasmin et al., 2016; Meshram et al., 2018]. Asimismo, la disponibilidad de estos métodos y dispositivos favorecería su uso por parte del consumidor, cada vez más preocupado por el impacto que sobre su salud ejerce la calidad nutricional y la seguridad alimentaria.

Una de las propuestas más racionales para dar solución a esta problemática tecnológica es el diseño de nuevos biosensores electroquímicos para el análisis de alimentos [Honeychurch & Piano, 2018], temática en la cual se desarrolla este trabajo de tesis doctoral.

5.2. Biosensores electroquímicos

Los biosensores electroquímicos son dispositivos analíticos integrados, compuestos por un elemento de reconocimiento de origen biológico incorporado o en contacto directo con un transductor electroquímico, capaces de proporcionar información analítica cuantitativa o semi-cuantitativa sobre un analito reconocido específicamente por el biorreceptor [Yáñez-Sedeño et al., 2015].

Estos sensores poseen la especificidad y selectividad inherente del receptor biológico, combinadas con la alta sensibilidad y bajos límites de detección proporcionados por el transductor electroanalítico [Grieshaber et al., 2008; Hammond et al., 2016]. Otras ventajas de los biosensores electroquímicos son su robustez, fácil miniaturización, capacidad de medida con volúmenes pequeños de muestras, y posibilidad de ser empleados en disoluciones turbias o que contengan compuestos ópticamente absorbentes y/o fluorescentes [Ronkainen et al., 2010; Rackus et al., 2015]. Asimismo, estos dispositivos son de fácil uso, no necesitan de protocolos complejos de pretratamiento de muestra, pueden ser producidos a escala industrial a costes relativamente bajos, y se pueden emplear como instrumentos electroanalíticos portables [Arduini et al., 2016; Abdulbari & Basheer, 2017].

En la **Figura 5.2** se representa el esquema general de un biosensor electroquímico.

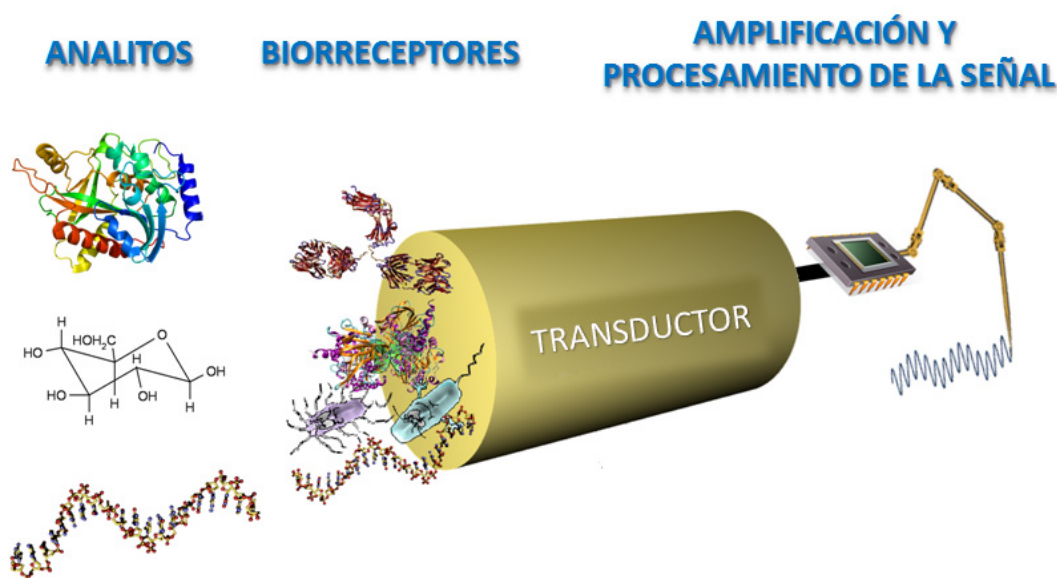


Figura 5.2. Representación esquemática de un biosensor electroquímico.

Los biosensores electroquímicos pueden clasificarse tanto por la naturaleza del mecanismo de biorreconocimiento del analito como por la técnica electroanalítica empleada en la medida [Pingarrón-Carrazón & Sánchez-Batanero, 1999]:

A) Clasificación basada en el mecanismo de biorreconocimiento:

- Biosensores electroquímicos catalíticos: Basados en procesos de reconocimiento y transformación del analito. Estos biosensores pueden emplear enzimas, tejidos y células como elemento de reconocimiento.
- Biosensores electroquímicos de afinidad: Se basan en la interacción de afinidad del analito con macromoléculas o estructuras moleculares complejas de forma específica, sin que se realice ninguna transformación química en la sustancia a determinar. En esta clasificación se incluyen los biosensores que emplean anticuerpos, lectinas, quimiorreceptores y ácidos nucleicos como elemento de reconocimiento.

B) Clasificación basada en la técnica electroanalítica:

- Biosensores amperométricos: Determinan cambios de corrientes eléctricas asociadas a procesos redox involucrados en el proceso de reconocimiento.
- Biosensores potenciométricos: Determinan cambios de potencial o de acumulación de carga asociados al proceso de reconocimiento. Pueden emplear electrodos selectivos a iones o transistores de efecto de campo.
- Biosensores conductimétricos: Detectan cambios en la conductancia de la muestra.
- Biosensores impedimétricos: Basados en medidas de impedancia sobre la superficie del electrodo.

Un claro ejemplo de la importancia de los biosensores electroquímicos en la actualidad es el volumen de mercado global que estos dispositivos representan, para el cual se estimó un valor de 12.8 billones de USD en 2018, y se prevé alcance los 23.7 billones de USD en 2022, con una tasa de crecimiento anual compuesto de 9.7% [Report Buyer, 2017]. Esta predicción de crecimiento se basa en la alta demanda social y económica de nuevos dispositivos de análisis portátiles para el establecimiento de protocolos de medicina personalizada y otras aplicaciones biomédicas, fundamentalmente dirigidas a la determinación de biomarcadores de dolencias crónicas y/o emergentes como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, tuberculosis, obesidad, enfermedades respiratorias crónicas, etc. [Sekretaryova et al.,

2016]. Del mismo modo, otras aplicaciones como el control *in situ* de la calidad y seguridad de alimentos, el monitoreo ambiental, el control de producciones agrícolas e industriales, y la protección contra el bioterrorismo también demandan este tipo de sistemas sensores [Vigneshvar et al., 2016].

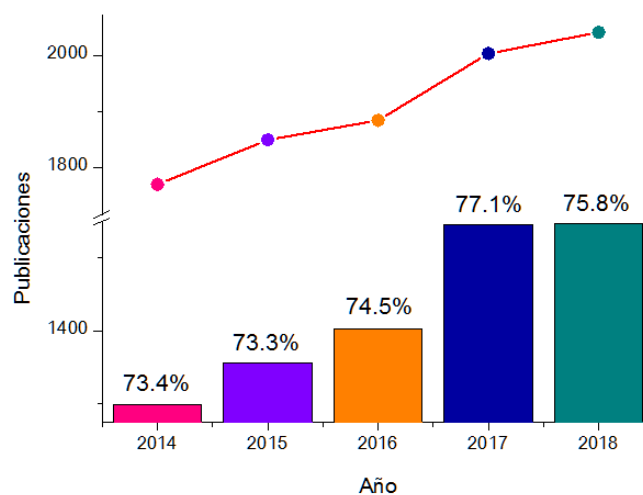


Figura 5.3. Producción científica global en el tema de biosensores electroquímicos durante 2014-2018 (Web of Science). Línea: artículos totales. Barras: biosensores con nanomateriales y porcentaje sobre el total de artículos.

Motivado por esta demanda, el desarrollo de biosensores electroquímicos ha centrado la atención de numerosas investigaciones durante los últimos años. Como se puede apreciar en la **Figura 5.3**, el número de publicaciones científicas en esta área ha crecido continuamente durante el último quinquenio, según datos reportados en la Web of Science. Debe destacarse que las publicaciones relacionadas con los biosensores electroquímicos representan como promedio el 36% de todos trabajos publicados en el área de los biosensores en este período.

Sin embargo, la transferencia de los resultados científicos del laboratorio al mercado está muchas veces limitada por las propiedades analíticas y operacionales de los biosensores diseñados, fundamentalmente en aspectos relacionados con la estabilidad, reproducibilidad y sensibilidad de los dispositivos [Da Silva Neves et al., 2018; Hoekstra et al., 2018]. Por este motivo, el desarrollo de nuevos métodos orientados a mejorar estas propiedades constituye una prioridad en la Química electroanalítica.

Las estrategias más comúnmente empleadas durante las últimas dos décadas para el diseño de biosensores electroquímicos con funcionalidad mejorada se basan en el uso de nanomateriales [Song et al., 2016; Wongkaew et al., 2018; Maduraiveeran et al., 2018]. Como puede observarse en la **Figura 5.3**, para más del

73% de los biosensores electroquímicos reportados en el período 2014-2018 se han empleado nanomateriales en su construcción. Dada la relevancia actual de los nanomateriales en la tecnología de los biosensores electroquímicos, y su relación directa con esta tesis doctoral, en los próximos acápite se profundizará sobre este tema.

5.2.1. Nanomateriales como elementos de transducción para biosensores electroquímicos

5.2.1.1. Nanomateriales

Los nanomateriales son materiales en los que al menos una de sus dimensiones se encuentra en el rango de la nanoescala, entre 1 y 100 nanómetros [Bianco et al., 2013]. Estos nuevos materiales constituyen los pilares fundamentales de las nanociencias y la nanotecnología, y han centrado las principales investigaciones en las ciencias e ingeniería de los materiales y sus aplicaciones durante las últimas décadas. Este interés alcanza también otras áreas de la ciencia como la química, la física, la biología y la ingeniería.

Existen diversos criterios para clasificar a los nanomateriales, en base a su origen, dimensionalidad, composición química, toxicidad potencial, etc. [Dolez, 2015; Buzea & Pacheco, 2017]. En la **Figura 5.4** se resumen los principales criterios de clasificación para estos materiales.

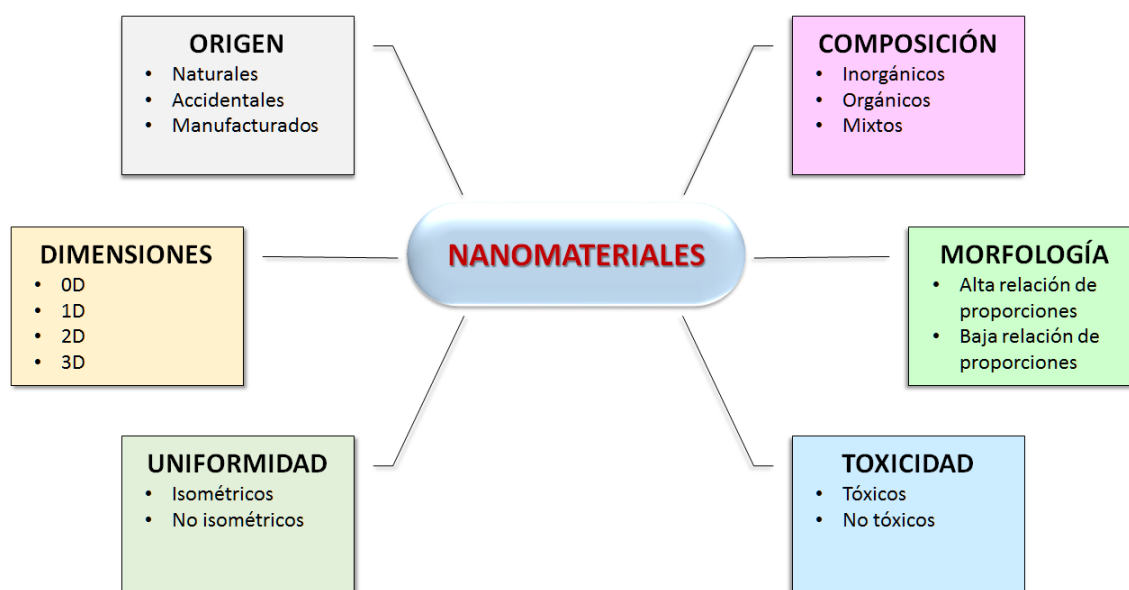


Figura 5.4. Clasificación de los nanomateriales.

Durante la última década, la producción científica relacionada con el área de los nanomateriales ha evolucionado de forma impresionante. Este hecho ha estado condicionado por las prometedoras aplicaciones de estos nuevos materiales, así como el carácter multidisciplinar de las investigaciones dedicadas a ellos que ha hecho converger el conocimiento de áreas anteriormente separadas y avanzar en nuevas aplicaciones. En la **Figura 5.5** se muestra el aumento progresivo del número de publicaciones científicas sobre los nanomateriales entre 2008 y 2018.

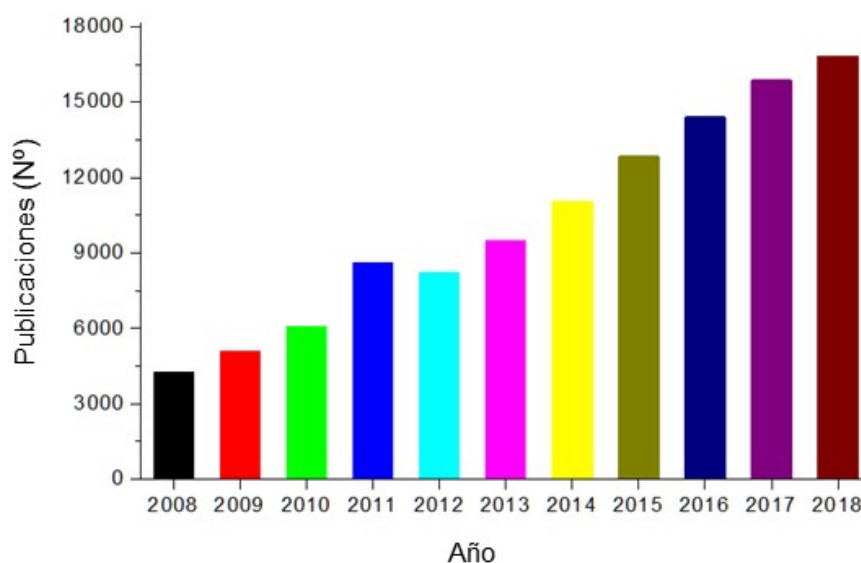


Figura 5.5. Producción científica global en el tema de nanomateriales durante 2008-2018 (Web of Science).

Este interés académico ha estado también motivado por el crecimiento continuo del mercado global de los nanomateriales, el cual alcanzó un valor de 7.3 billones de USD en 2016 y se espera alcance los 16.8 billones de USD para 2022 con una tasa de crecimiento anual compuesto de 15.5 % para este período [Zion Market Research, 2017]. Debe destacarse que este mercado se relaciona directamente con el de los productos basados en nanotecnologías, el cual se espera alcance un valor de mercado global de 125 billones de USD para 2024, según estudios recientes [Research and Markets, 2018].

Esta proyección de mercado tiene como base las actuales aplicaciones de los nanomateriales en diversas áreas económicas, así como la expectativa de que estos ayuden a dar respuesta a muchos de los problemas a los que se enfrenta la sociedad en la actualidad. En la **Figura 5.6** se representan algunas de las aplicaciones más prometedoras para estos nuevos materiales [Tsuzuki, 2009]. Entre ellas es de

destacar la importancia de los nanomateriales en el diseño de nuevos sistemas sensores, entre los que se encuentran los biosensores electroquímicos.

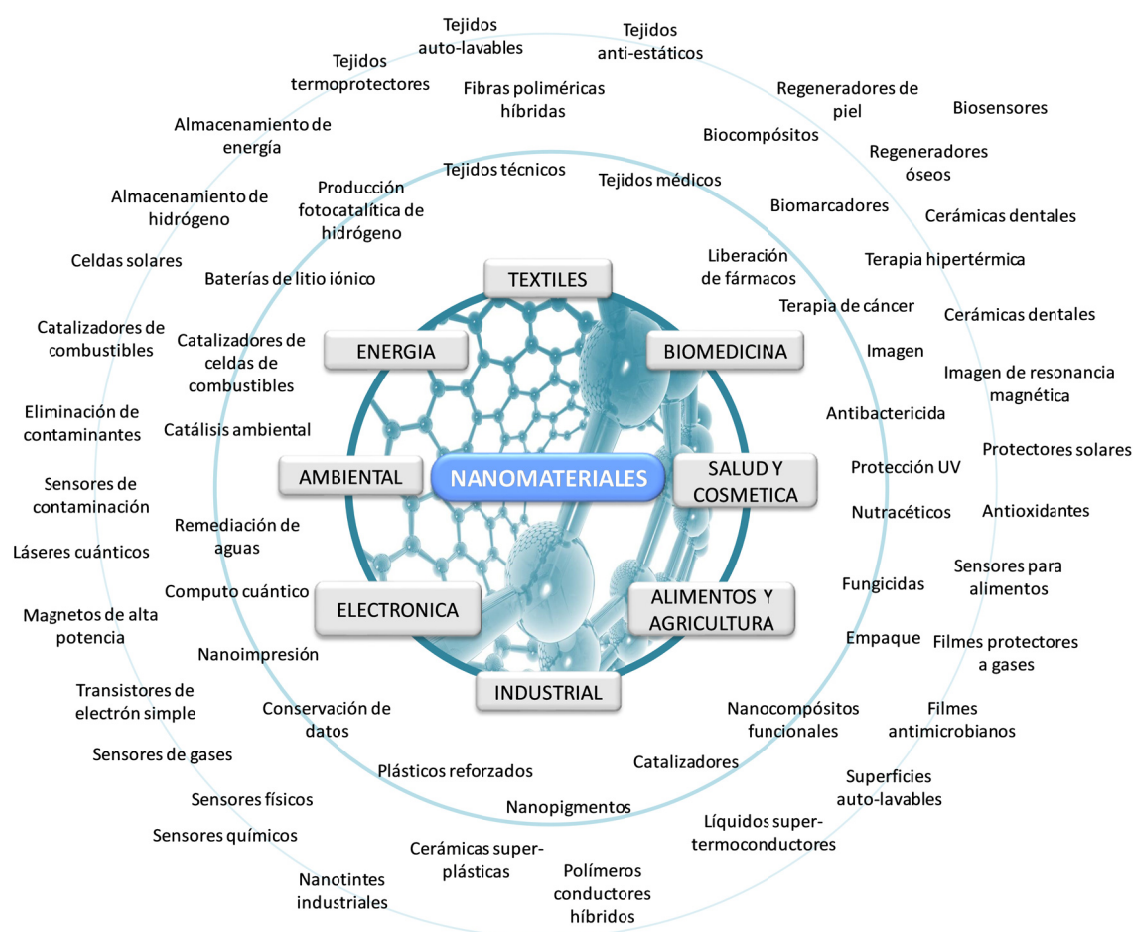


Figura 5.6. Aplicaciones de los nanomateriales en diferentes áreas [Tsuzuki, 2009].

5.2.1.2. Biosensores electroquímicos nanoestructurados

Como se ha planteado con anterioridad, el uso de nanomateriales ha sido la corriente fundamental seguida por la comunidad científica para mejorar las propiedades analíticas, operacionales y de estabilidad de los biosensores electroquímicos [Song et al., 2016; Wongkaew et al., 2018; Maduraiveeran et al., 2018]. Estos materiales pueden emplearse como elementos de transducción, de marcaje o como amplificadores de la señal electroanalítica en los biosensores electroquímicos.

En este contexto, destaca el uso de nanomateriales electroconductores como elementos de transducción en estos biosensores, dadas las características excepcionales que presentan estos materiales, entre las que destacan las siguientes

[Yáñez-Sedeño et al., 2015; Song et al., 2016; Wongkaew et al., 2018; Maduraiveeran et al., 2018]:

- Los nanomateriales poseen una elevada relación entre el área superficial y el volumen. Esta característica, en el caso de aquellos con propiedades electroconductoras, proporciona grandes áreas superficiales electroquímicamente activas a los electrodos modificados con dichos nanomateriales, lo cual se traduce en una mayor capacidad de detección.
- Esta mayor área superficial favorece una mayor densidad de biomoléculas inmovilizadas sobre la superficie del electrodo, mejorando así la sensibilidad de los análisis.
- La capacidad electroconductora de estos nanomateriales contribuye a acelerar los procesos de transferencia electrónica entre los electrodos y las moléculas objeto del análisis, reduciendo por tanto los tiempos de respuesta analítica.
- En el caso de biosensores basados en metaloenzimas, estos nanomateriales pueden actuar como nanoconectores entre la superficie de los electrodos y el centro activo de dichas proteínas, permitiendo el diseño de biosensores de tercera generación en los cuales no es necesario emplear mediadores redox.
- Los electrodos nanoestructurados funcionan como ensamblados de nanoelectrodos, lo cual contribuye a reducir los límites de detección analítica al poseer una relación mayor entre la corriente faradaica y capacitiva que los electrodos no nanoestructurados.

Otras propiedades que favorecen el uso de nanomateriales, conductores o no conductores, como elementos de transducción en el diseño de biosensores electroquímicos son las siguientes [Hrapovic et al., 2004; Wang & Dai, 2015]:

- Algunos nanomateriales poseen propiedades electrocatalíticas, por lo cual aceleran la velocidad de transformación de algunos compuestos redox sobre la superficie de los electrodos, favoreciendo la realización de medidas a menores valores de potencial con la consiguiente eliminación de posibles interferencias.
- Los nanoensamblajes tridimensionales sobre la superficie de los electrodos crean microentornos estables y favorables para el mantenimiento de la estructura biológicamente activa de las biomoléculas, aumentando así la estabilidad de los biosensores.

- Los nanomateriales pueden actuar como unidades de ensamblaje supramolecular con propiedades funcionales únicas, permitiendo el diseño de una gran variedad de arquitecturas sobre los electrodos.

En la **Figura 5.7** se muestra la distribución porcentual de trabajos publicados en los períodos 2008-2018 y 2014-2018 sobre biosensores nanoestructurados, en función del nanomaterial empleado. Indudablemente, las nanopartículas constituyen los nanomateriales más usados en la construcción de biosensores electroquímicos. En esta familia se incluyen las nanopartículas metálicas, las de óxido de metales y las no metálicas. En la última década, los nanotubos de carbono ocupan el segundo lugar en interés para estas aplicaciones. Sin embargo, como se puede apreciar, el último quinquenio se ha caracterizado por un notable incremento del uso del grafeno y sus derivados para el diseño de biosensores electroquímicos, ubicándose en el segundo lugar de esta distribución en el período 2014-2018.

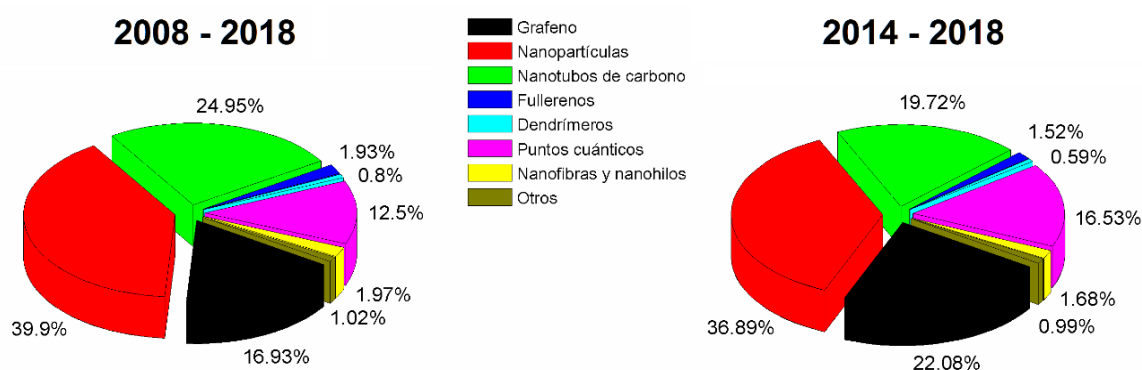


Figura 5.7. Distribución porcentual de los trabajos publicados en el tema de biosensores electroquímicos basados en nanomateriales durante 2008-2018 y 2014-2018, en función del nanomaterial empleado (Web of Science).

Este mayor interés por el grafeno y sus derivados se debe a las propiedades excelentes de este nanomaterial como elemento de transducción para biosensores electroquímicos, aspecto que detallaremos a continuación.

5.2.1.3. Biosensores electroquímicos basados en grafeno y óxido de grafeno

Uno de los hitos científicos que más ha impactado en la tecnología de los biosensores electroquímicos en los últimos años ha sido el descubrimiento del grafeno por Geim y Novoselov en 2004 [Novoselov et al., 2004]. Desde ese momento, este nanomaterial ha sido objeto de numerosas investigaciones encaminadas a desarrollar nuevas plataformas bioelectroanalíticas empleando electrodos nanoestructurados con

este material [Shao et al., 2010; Bollella et al., 2017; Justino et al., 2017]. Asimismo, su versatilidad ha permitido diseñar nuevas estrategias de marcaje y amplificación de la señal analítica basadas en derivados de grafeno de menores dimensiones [Hasanzadeh et al., 2016].

El amplio uso del grafeno en este campo científico se debe a la estructura única de este nanomaterial, la cual condiciona sus excelentes propiedades funcionales [Meyer et al., 2007; Ishigami et al., 2007]. El grafeno es un material formado por átomos de carbono con hibridación sp_2 enlazados mediante uniones covalente tipo σ , y distribuidos de forma ordenada en un espacio bidimensional (**Figura 5.8**). Por otra parte, los electrones localizados en los orbitales p se posicionan perpendicularmente al plano, solapándose lateralmente y originando orbitales π , lo cual contribuye a la deslocalización electrónica y a la conducción eléctrica en el material.

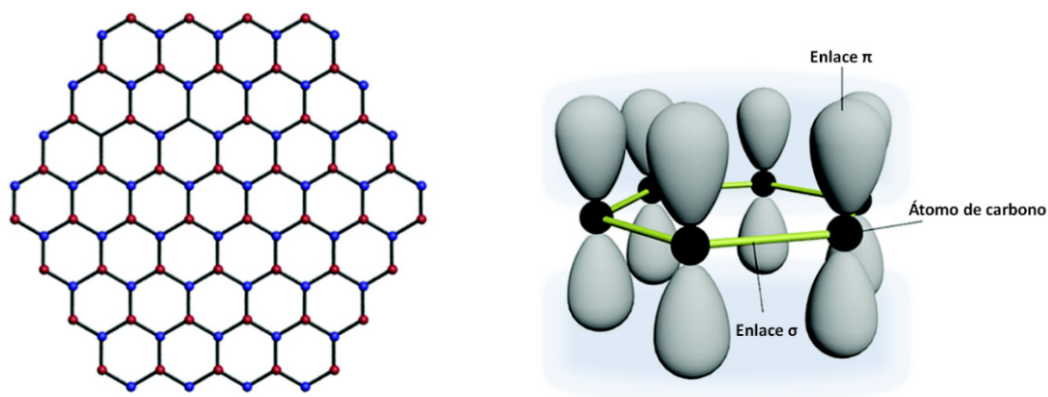


Figura 5.8. Representación esquemática de la estructura del grafeno.

La combinación de estos enlaces σ y π y su morfología plana proporcionan al grafeno propiedades excepcionales para su uso en biosensores electroquímicos, entre las que destacan [Shao et al., 2010; Bollella et al., 2017; Justino et al., 2017]:

- Elevada área superficial de $2600 \text{ cm}^2/\text{g}$.
- Alta conductividad térmica y eléctrica.
- Excelente estabilidad térmica y alta resistencia a la oxidación.
- Alta elasticidad y dureza.
- Alta resistencia mecánica.
- Fácil modificación química
- Amplia ventana de potencial y baja resistencia a la transferencia de carga.

- Excelente actividad electrocatalítica.
- Buenas propiedades fotoeléctricas.

En los últimos años se han desarrollado distintas tecnologías para la producción de grafeno, cuyos productos presentan diferencias tanto en composición, como en tamaño y número de capas. Los métodos de obtención de grafeno pueden dividirse en dos grupos principales [Kim et al., 2010]:

- Métodos Bottom-up: Consisten en la obtención de grafeno a partir de entes menores, como moléculas. Dentro de estos métodos está el crecimiento epitaxial (CVD sobre sustratos metálicos y cerámicos, la descomposición térmica de SiC), y la síntesis química (síntesis orgánica).
- Métodos Top-down: Consisten en la obtención de grafeno a partir de un ente que lo contenga, como por ejemplo grafito. Dentro de estos métodos está la exfoliación micromecánica de grafito, la exfoliación de grafito en fase líquida y la exfoliación química de materiales grafiticos, basados en la intercalación entre las capas, posterior oxidación (no siempre) y finalmente su exfoliación.

El resultado de estos métodos de producción son grafenos con distintas calidades, tamaños y número de capas apiladas, y por tanto, con distintas propiedades. Aunque el grafeno posee una morfología de lámina individual, la preparación de materiales con estas características es un proceso relativamente costoso y engorroso. Por este motivo, en la literatura científica se puede encontrar que bajo el término “grafeno” se describen materiales de una sola capa, así como otros formados por dos o más láminas apiladas y unidas mediante fuerzas de Van der Waals e interacciones entre orbitales π .

El grafeno ha sido empleado en la construcción de un gran número de biosensores electroquímicos catalíticos y de afinidad, empleando diferentes métodos de detección. En la **Tabla 5.1** se muestran algunos ejemplos representativos de estos dispositivos. Aunque las propiedades del grafeno se ven afectadas por el número de capas que posea el material, debe señalarse que muchos autores no detallan específicamente las características morfológicas del nanomaterial empleado en la construcción de biosensores electroquímicos, lo cual limita la posterior reproducción de los resultados obtenidos.

Sin embargo, la mayor aplicación del grafeno como elemento de transducción en biosensores electroquímicos se ve afectada por su alta hidrofobicidad y baja solubilidad, lo cual dificulta la preparación de dispersiones estables para su uso en la

modificación de las interfaces sensoras. Asimismo, la ausencia de grupos funcionales sobre la superficie del grafeno limita la inmovilización estable de los biorreceptores sobre la superficie electródica mediante enlaces covalentes [Araque et al., 2013; Araque et al., 2014a,b; Cincotto et al., 2015]. Este hecho desfavorece la construcción de biosensores electroquímicos robustos y reproducibles. Por tal motivo, la mayor parte de los trabajos reportados en este tema emplean derivados químicos del grafeno como agentes de modificación de los electrodos.

Tabla 5.1. Biosensores electroquímicos basados en electrodos modificados con grafeno.

TIPO	ELECTRODO	ANALITO	MÉTODO DETECCIÓN	REFERENCIA
Enzimático	Gr/Chit/PtNP/Tyr/SPE	L-tirosina	SWV	[Apetrei et al., 2019]
Enzimático	La/Gr-CMF/SPCE	Catecol	Amperometría	[Palanisamy et al., 2017]
Enzimático	Gr-Au-Chit/Tyr/SPCE	Compuestos fenólicos.	DPV	[Fartas et al., 2017]
Enzimático	CS-GOx/Gr-PANI/Pt	Glucosa	Amperometría	[Feng et al., 2015]
Enzimático	3D Gr/CNTs hibrid	Glucosa	DET	[Thakoor et al., 2015]
Enzimático	Tyr/GNP-TNT/GCE	Catecol	AC EIS	[Liu et al., 2015]
Inmunosensor	Gr-Au /SPE	PSA	Amperometría	[Jang et al., 2015]
Aptasensor	GNPs/Gr /GCE	BPA	CV	[Zhou et al., 2014]
Genosensor	AgNPs-Pdop@Gr	DNA	DPV	[Huang et al., 2014]
Enzimático	FDH /Gr/SPE	Fructosa	Amperometría	[Antiochia & Gorton, 2014]
Aptasensor	Gr/ Si/SiO ₂ /TBA-MB	K ⁺ , Pb ²⁺	FET	[Xu et al., 2014]

Gr: grafeno; **Chit:** quitosán; **PtNPs:** nanopartículas de platino; **Tyr:** tirosinasa; **SWV:** voltamperometría de onda cuadrada; **SPE:** electrodo serigrafiado; **La:** lacasa; **Gr-CMF:** microfibras de grafeno-celulosa; **SPCE:** electrodo serigrafiado de carbono; **DMF:** dimetilformamida; **DPV:** voltametría diferencial de impulsos; **CS:** esferas de carbono; **GOx:** glucosa oxidasa; **PANI:** polianilina; **CNT:** nanotubos de carbono; **GNPs:** grafeno punteado de nanopartículas; **BPA:** bisfenol A; **AgNP:** nanopartículas de plata; **GNP-TNT:** nanoplaquetas de grafeno-nanotubos de TiO₂; **GCE:** electrodo de carbono vitrificado; **PSA:** antígeno prostático específico; **Pdop:** polidopamina; **FDH:** fructosa deshidrogenasa; **TBA:** trombina, **MB:** azul de metileno; **FET:** transistor de efecto de campo.

El derivado más comúnmente utilizado para estas aplicaciones es el óxido de grafeno, el cual también se utiliza como precursor para la preparación de otros derivados y nanohíbridos [Wang et al., 2011; Kuila et al., 2011; Nag et al., 2018; Krishnan et al., 2019]. El óxido de grafeno es un material formado por carbono, oxígeno e hidrógeno (**Figura 5.9**), el cual se obtiene tras el tratamiento del grafito con oxidantes fuertes. El procedimiento más utilizado para la obtención del óxido de grafeno es el llamado método Hummers, el cual se basa en el tratamiento del grafito con KMnO₄ y H₂SO₄ concentrado, en presencia de NaNO₃ [Guerrero-Contreras

& Caballero-Briones, 2015]. En la **Figura 5.10** se representa este proceso de obtención del óxido de grafeno.

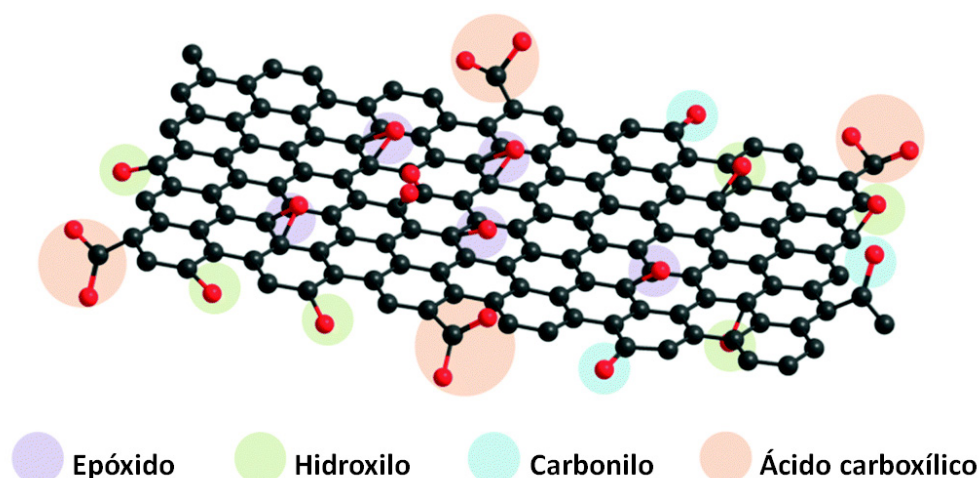


Figura 5.9. Representación esquemática de la estructura del óxido de grafeno.

En este derivado, los procesos de oxidación producen la aparición de grupos epóxido, carbonilo, carboxilo e hidroxilo que disminuyen la interacción entre capas y aumentan el carácter hidrofílico del material [Chen et al., 2012]. El óxido de grafeno se puede dispersar en agua, así como en disolventes orgánicos como el dihidrofurano, N-metil pirrolidona, dimetilformamida, o-xilano y etilenglicol. Asimismo, estos grupos funcionales pueden ser empleados como centros de inmovilización covalente de los biorreceptores para el ensamblaje de biosensores electroquímicos. Estas propiedades han favorecido que el uso del óxido de grafeno en la tecnología de los biosensores electroquímicos sea muy extenso.

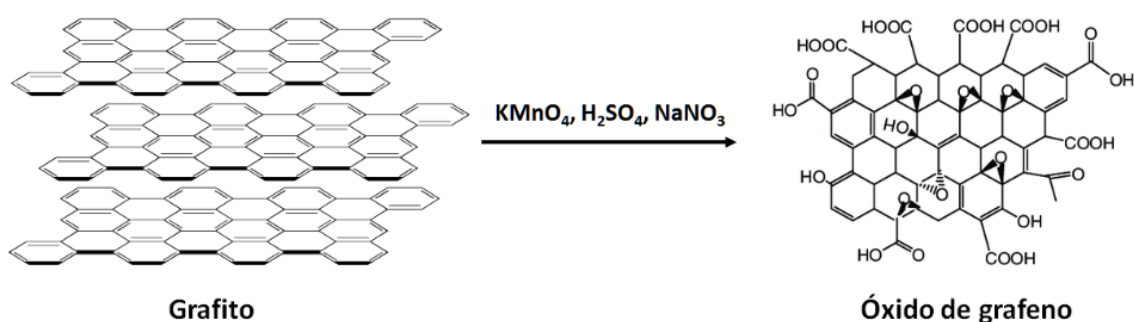


Figura 5.10. Representación del método Hummers de obtención del óxido de grafeno.

En la **Tabla 5.2** se muestran algunos ejemplos representativos de biosensores basados en este nanomaterial.

Tabla 5.2. Biosensores electroquímicos basados en electrodos modificados con óxido de grafeno.

TIPO	ELECTRODO	ANALITO	MÉTODO DETECCIÓN	REFERENCIA
Aptasensor	rGO-AuNPs -MB/GCE	AR	CV,EIS,SWV	[Crulhas et al., 2019]
Enzimático	Ty/IrONP/rGO/SPE	Captopril	CV	[Kurbanoglu et al., 2017]
Inmunosensor	GO/Fc-CS/Au NPs/GE	HBsAg	Amperometría	[Zhao et al., 2017]
Inmunosensor	Anti-IgG-GO/SPCE	IgG	DPV	[Jumpathong et al., 2016]
Enzimático	Ppy- β -CD/rGO/TY/GCE	Catecol;dopamina	Amperometría	[Fritea et al., 2015]
Inmunosensor	GNW-GO /anti-AFP/CuS-GO/ SPE	AFP	Cronoamperometría	[Li et al., 2015]
Aptasensor	Ag@ Pt-rGO /GSPE	TNF- α	DPV	[Mazloun-Ardakani et al., 2015]
Inmunosensor	rGO/Thi-AuNP/anti-CEA/ITO E	CEA	SWV	[Jia et al., 2014]
Inmunosensor	rGO/PB-AuNP/anti-AFP/ITO E	AFP	SWV	[Jia et al., 2014]
Inmunosensor	anti-AFB1/GO/AuGCE	AFB1	EIS	[Srivastava et al., 2014]

rGO: óxido de grafeno reducido; **AuNP:** nanopartículas de oro; **MB:** azul de metileno; **GCE:** electrodo de carbono vitrificado; **AR:** receptor de andrógenos humano; **CV:** voltametría cíclica; **SWV:** voltamperometría de onda cuadrada; **EIS:** espectroscopía de impedancia electroquímica; **Ty:** tirosinasa; **IrONP:** nanopartículas de óxido de iridio; **SPE:** electrodo serigrafiado; **GO:** óxido de grafeno; **Fc-CS:** ferroceno-quitosano; **HBsAg:** antígeno de hepatitis B; **GE:**electrodo de oro; **IgG:** inmunoglobulina humana G; **DPV:** voltamperometría de pulso diferencial; **SPCE:** electrodo serigrafiado de carbono; **Anti-IgG:** anti cuerpo específico para IgG; **Ppy- β -CD:** polipirrol modificado con β -ciclodextrina; **AFP:** α -fetoproteína; **Anti AFP:** anticuerpo contra AFP; **GNW/GO:** hojas de grafeno funcionalizadas con nanohilos de oro; **CuS/GO:** grafeno decorado con nanopartículas de CuS; **Ag@Pt-rGO:** núcleo de plata y platino cubierto con óxido de grafeno reducido; **GSPE:** electrodo de oro impreso en pantalla; **TNF α :** factor de necrosis tumoral α ; **Thi:** tionina; **Anti-CEA:** anticuerpo carcinoembrionario; **ITO E:** electrodo de óxido de estaño e indio; **CEA:** antígeno carcinoembrionario; **AFB1:** aflatoxina B1.

La principal limitación que presenta el óxido de grafeno es la pérdida parcial de sus propiedades electroconductoras debido a los defectos estructurales, vacantes y grupos oxigenados producidos durante el proceso de oxidación, los cuales interrumpen la red carbonácea sp_2 y por tanto la conjugación π [Gómez-Navarro et al., 2010]. Este efecto puede mitigarse parcialmente mediante la reducción química o electroquímica del nanomaterial. El derivado reducido reúne características tanto de grafeno como de su óxido, y puede dar lugar a materiales con buena conductividad, estabilidad térmica y capacidad de procesamiento, manteniendo los grupos ácido carboxílico disponibles para su uso en la inmovilización de los biorreceptores.

Por otra parte, las propiedades funcionales y posibilidades de aplicación de este nanomaterial pueden incrementarse notablemente mediante su transformación química o funcionalización con otros nanomateriales, produciendo nuevos derivados funcionalizados o nanohíbridos [Yáñez-Sedeño et al., 2015].

5.2.1.4. Biosensores electroquímicos basados en nanohíbridos de óxido de grafeno.

Un **nanomaterial híbrido** o **nanhíbrido** puede definirse como una combinación intencionada de al menos un nanomaterial, con uno o más materiales, a nivel atómico o nanométrico, complementándose cada uno de ellos para tener nuevas y/o mejoradas funciones y propiedades [Yañez-Sedeño et al., 2015]. Esta definición elimina la posibilidad de confundir a este tipo de materiales con los nanomateriales compósito, los cuales se obtienen mediante mezcla o combinación física de los materiales constituyentes, sin que medie entre ellos unión química alguna.

Debe destacarse que la unión química o interacción intersticial a nivel atómico o nanométrico que existe en los nanohíbridos aseguran una mayor interrelación entre los materiales constituyentes, lo cual determina que estos nuevos nanomateriales presenten propiedades sinérgicas o completamente nuevas, las cuales no representan solo la suma de las propiedades presentadas por los materiales constituyentes.

El óxido de grafeno puede combinarse con otros materiales orgánicos o inorgánicos para producir nanomateriales híbridos con nuevas propiedades físico-químicas. Los métodos más comúnmente empleados para producir estos nuevos materiales se describen a continuación [Compton & Nguyen, 2010; Dreyer et al., 2010; Georgakilas et al., 2016]:

- Uniones covalentes: Pueden llevarse a cabo por modificación de las regiones de grafeno mediante reacciones de Diels-Alder, injertos con sales de diazonio, cicloadición, etc. Asimismo, los grupos oxigenados del material de carbono pueden ser transformados mediante reacción con grupos nucleofílicos (amino, hidroxilo, silano, isocianato, etc.).
- Uniones no covalentes: Las más comunes son las interacciones de tipo π - π con compuestos aromáticos como los derivados de pireno.
- Intercalación: Entre las capas de grafeno pueden intercalarse moléculas poliméricas, otros nanomateriales, etc. Este tipo de transformación solo es factible para nanomateriales con bajo grado de oxidación o con láminas de gran dimensión, entre las que ocurran fuertes asociaciones entre las regiones no oxidadas.

Los derivados de óxido de grafeno preparados por estos métodos pueden clasificarse en dos grandes familias de nanohíbridos [Dreyer et al., 2010; Loh et al., 2010]:

- Materiales híbridos con compuestos orgánicos, en los que el óxido de grafeno se combina con polímeros naturales o sintéticos, dendrímeros compuestos organometálicos (MOFs), materiales orgánicos porosos, etc.
- Materiales híbridos inorgánicos, en los que el óxido de grafeno se combina con especies inorgánicas metálicas y no metálicas, tales como nanopartículas, nanotubos de carbono, fullerenos, puntos cuánticos, etc.

La funcionalización de derivados de óxido de grafeno con nanopartículas metálicas, fundamentalmente de metales nobles, es una de las estrategias más utilizadas para preparar nanohíbridos con vista a construir biosensores electroquímicos [Yola et al., 2015; Alonso-Cristobal et al., 2015; Tahernejad-Javazmi et al., 2018; Kumarasamy et al., 2018]. Este hecho se sustenta por las excelentes propiedades que poseen este tipo de nanopartículas que favorecen su uso como elementos de transducción en biosensores electroquímicos. Entre las propiedades más relevantes destacan la alta conductividad eléctrica de las nanopartículas metálicas, característica que favorece la rápida ocurrencia de procesos de transferencia electrónica en la superficie de los electrodos.

Por otra parte, estas nanopartículas presentan una alta afinidad por las moléculas proteicas [Pingarrón et al., 2008]. Este hecho, unido a la elevada relación entre el área superficial y el volumen, permiten la inmovilización de una alta densidad de biorreceptores en su superficie, lo cual favorece la construcción de biosensores electroquímicos altamente sensibles. Debe destacarse además que las nanopartículas metálicas pueden ser fácilmente funcionalizadas con ligandos tiolados, lo cual permite la preparación de una gran variedad de derivados capaces de ser empleados como sustratos para la inmovilización covalente de los biorreceptores.

En los casos en que el elemento de reconocimiento empleado sea una metaloenzima, el pequeño tamaño y la alta densidad de electrones sobre la superficie de las nanopartículas metálicas favorece la transferencia directa de electrones entre el centro redox en el sitio activo de la enzima y el material del electrodo. Este fenómeno, que ocurre a través de mecanismos de efecto túnel, ofrece la ventaja de preparar biosensores enzimáticos de tercera generación, los cuales no precisan de mediadores redox para la medida.

Un aspecto importante a tener en cuenta es la capacidad de muchas nanopartículas metálicas de catalizar la transformación de diferentes compuestos de interés electroanalítico, tales como NADH, H_2O_2 y O_2 , sobre la superficie de los electrodos [Guo & Wang, 2007]. Este efecto electrocatalítico permite el diseño de

biosensores capaces de operar a bajos valores de potencial, lo cual reduce el posible efecto de sustancias interferentes.

Las nanopartículas de metales nobles poseen baja reactividad química, así como elevados valores de potencial de oxidación [Pingarrón et al., 2008]. Por lo tanto, estos nanomateriales no interfieren en las mediciones electroquímicas. Finalmente, debe destacarse que estos nanomateriales pueden ser preparados con morfologías, tamaños y funcionalidad química bien definidas a partir de estrategias generalmente poco complejas y muy reproducibles. Este hecho permite el diseño a la medida de nanomateriales capaces de formar arquitecturas tridimensionales estables sobre la superficie de los electrodos.

Las nanopartículas metálicas más comúnmente empleadas para preparar nanohíbridos con el óxido de grafeno son las de metales nobles, como Au, Ag, Pd y Pt. Para la preparación de este tipo de nanohíbridos las nanopartículas pueden ser unidas mediante enlaces químicos a la estructura del óxido de grafeno, generalmente después de un paso de transformación previa de alguno de los dos nanomateriales. Debe destacarse que esta estrategia de decoración superficial de las láminas del óxido de grafeno ha sido la más empleada para la construcción de nanohíbridos con interés electroanalítico, en aras de aprovechar las ventajas que ofrece mantener expuesta la superficie de las nanopartículas metálicas [Yola et al., 2015; Alonso-Cristobal et al., 2015; Tahernejad-Javazmi et al., 2018; Kumarasamy et al., 2018]. Otra estrategia de preparación se basa en la intercalación de las nanopartículas entre capas del nanomaterial de carbono, o su encapsulación en estas [Myung et al., 2011]. En la **Tabla 5.3** se describen algunos de los trabajos reportados en la bibliografía durante los últimos años, en los que se han construido biosensores electroquímicos basados en electrodos nanoestructurados con diversos nanohíbridos de este tipo.

Tabla 5.3. Biosensores electroquímicos basados en electrodos modificados con nanohíbridos de óxido de grafeno y nanopartículas metálicas.

TIPO	ELECTRODO	ANALITO	MÉTODO DETECCIÓN	REFERENCIA
Enzimático	PtNPs/rGO	Glucosa	DET	[Akkaya et al., 2018]
Inmunosensor	GO/AuNPs	<i>Cronobacter sakazakii</i>	DPV	[Shukla et al., 2018]
Enzimático	AuNPs/rGO	Glucosa	Amperometría	[Çakiroglu & Ozacar, 2017]
Inmunosensor	MgO nanoflores/GO-AuNPs	miRNA	ECC	[Shuai et al., 2017]
Genosensor	pDNA/GO/NiF/Ch/ITO	<i>E. coli</i>	DPV	[Tiwari et al., 2015]
Enzimático	AChE/PB-CS /ErGO-AuNPs-β-CD/GCE	Malatión, carbaril	Amperometría	[Zhao et al., 2015]
Enzimático	PRGO-AuNPs/GOx/GCE	Glucosa	Amperometría	[Sabury et al., 2015]
	AuNP -rGO/ GCE	NADH	Amperometría	[Govindhan et al., 2015]
Enzimático	Au-rGO/PtPdNPs/GOx	Glucosa	Amperometría	[Hossain & Park, 2014]

PtNPs: nanopartículas de platino; **AuNP:** nanopartículas de oro; **rGO:** óxido de grafeno reducido; **GO:** óxido de grafeno; **DET:** transferencia directa de electrones; **PdNPs:** nanopartículas de paladio; **miRNA:** micro ácido ribonucleico; **ECC:** sistema electroquímico-químico-químico; **pDNA:** sonda de ADN; **NiF:** ferrita níquel; **Ch:** quitosano; **ITO:** óxido de estaño e indio; **DPV:** voltamperometría de pulso diferencial; **AChE:** acetilcolinesterasa; **PB:** azul de Prusia; **ErGO:** óxido de grafeno electroquímicamente reducido; **β-CD:** β-ciclodextrina; **GCE:** electrodo de carbono vitrificado; **PRGO:** óxido de grafeno parcialmente reducido; **NADH:** nicotinamida adenina dinucleótido; **GOx:** glucosa oxidasa.

Otra estrategia comúnmente empleada en la construcción de nanohíbridos de óxido de grafeno con fines electroanalíticos es su conjugación con polímeros [Lei et al., 2014; Araque et al., 2013; Araque et al., 2014b; Boujakhrou et al., 2015]. Estos polímeros pueden ser tanto naturales como sintéticos, y en dependencia de su composición y estructura química pueden conferir diferentes propiedades al híbrido resultante. A modo de ejemplo, citaremos algunas de las más relevantes para los biosensores electroquímicos.

- La conjugación con polímeros electroconductores aumenta la conductividad general del nanohíbrido resultante y favorece los fenómenos de transferencia electrónica sobre la superficie del electrodo modificado.
- La estructura 3D de las cadenas poliméricas crea un entorno tridimensional favorable para el mantenimiento de la conformación activa de los biorreceptores inmovilizados sobre el electrodo, aumentando su estabilidad funcional. Este efecto está más favorecido en nanohíbridos basados en polímeros hidrofílicos, pues estas moléculas estabilizan la monocapa hidrofílica alrededor de los biorreceptores recreando el microentorno en que se encuentran estos en la célula.

- La presencia de grupos funcionales reactivos en las moléculas poliméricas favorece la posterior inmovilización estable de los biorreceptores mediante enlaces covalente. Por otra parte, la presencia de grupos iónicos o polares no reactivos favorece la inmovilización no covalente del biorreceptor, y contribuyen a su estabilización conformacional mediante uniones multipuntuales no covalentes.
- Los grupos funcionales en las moléculas de los polímeros pueden favorecer el ensamblaje de arquitecturas capa-a-capa más complejas sobre la superficie del electrodo, empleando otros polímeros o nanomateriales con grupos funcionales complementarios. Estas arquitecturas tridimensionales pueden contribuir al aumento de la densidad de biorreceptores inmovilizados sobre el electrodo, así como a su estabilización conformacional.

Para el diseño de nanohíbridos con polímeros se requiere además de un control adecuado del peso molecular promedio de estos, su grado de dispersión, distribución al azar, en bloques o alternados de grupos funcionales en polímeros con más de un tipo de monómero o unidad composicional, etc. Estas características muchas veces no son descritas en los trabajos donde se reporta la preparación de nanohíbridos con polímeros para su uso en biosensores electroquímicos, lo que dificulta la posterior reproducción de los resultados.

En la **Tabla 5.4** se reportan algunos trabajos recientes sobre biosensores electroquímicos basados en electrodos nanoestructurados con nanohíbridos de óxido de grafeno y polímeros.

Tabla 5.4. Biosensores electroquímicos basados en electrodos modificados con nanohíbridos de óxido de grafeno y polímeros.

TIPO	ELECTRODO	ANALITO	MÉTODO DE DETECCIÓN	REFERENCIA
Enzimático	PEDOT:PSS-rGO-AuNPs-HRP/SPE	H ₂ O ₂	Amperometría	[Mercante et al., 2017]
Genosensor	ssDNA-GO-Cs-GCE	<i>Escherichia coli</i> , O157:H7 DNA	EIS	[Xu et al., 2017]
Inmunosensor	PPy/ anti-AFB1-PPa/rGO	AFB1	EIS	[Wang et al., 2015]
Enzimático	PANI-SPANI-rGO-Cyt c	H ₂ O ₂	Amperometría	[Vilela et al., 2015]
	Nf-ERGO-GCE	Bilirubina	SWV	[Avan et al., 2015]
Enzimático	PPy-rGO- GOx-GCE	Glucosa	Amperometría	[Lin et al., 2014]

PEDOT: poli (3,4-etilendioxitiofeno); **PSS:** poli (estirenosulfonato), **rGO:** óxido de grafeno reducido; **AuNP** nanopartículas de oro; **HRP:** peroxidasa de rábano picante; **ssDNA:** ácido desoxirribonucleico monocatenario; **GO:** óxido de grafeno; **Cs:** quitosano; **GCE:** electrodo de carbono vitrificado; **EIS:** espectroscopía de impedancia electroquímica; **PPy:** polipirrol; **PPa:** ácido pirrolpropílico; **anti-AFB1:** anticuerpo contra AFB1 mAb; **AFB1:** Aflatoxina B1; **PANI-SPANI:** ácido polianilina-polianilina-2-sulfónico; **Cyt c:** proteína citocromo c; **Nf:** nafion. **ERGO:** óxido de grafeno electroquímicamente reducido; **SWV:** voltamperometría de onda cuadrada; **GOx:** glucosa oxidasa.

En este trabajo se empleó un nanohíbrido de óxido de grafeno y O-carboximetilcelulosa como elemento de transducción para la construcción de biosensores electroquímicos enzimáticos con arquitectura capa-a-capa, utilizando dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) como unidades de ensamblaje intermedias.

La O-carboximetilcelulosa (CMC) es un polisacárido aniónico lineal formado por unidades de D-glucopiranososa y O-(carboximetil)-D-glucopiranososa unidas por enlaces glicosídicos $\beta(1-4)$ [Lopez et al., 2015]. La estructura de la sal sódica de este polímero se representa en la **Figura 5.11**.

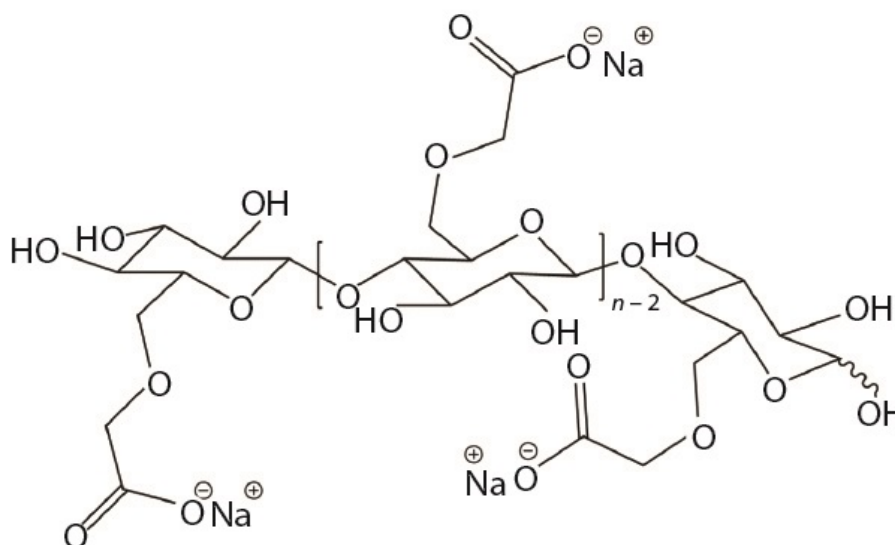


Figura 5.11. Estructura de la sal sódica de la CMC.

La CMC es un producto industrial que se prepara por tratamiento de la celulosa con ácido cloroacético en medio fuertemente alcalino [Heinze & Koschella, 2005]. A partir de este proceso, se introducen grupos $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ en las unidades de glucosa, los cuales confieren una alta solubilidad en agua, hidrofiliidad e higroscopicidad al polisacárido resultante. Por otra parte, el gran volumen de los grupos carboximetilo impide la formación de puentes de hidrógeno internos en las cadenas del polisacárido, a diferencia que en la celulosa, dejando los anillos de D-glucosa totalmente expuestos a las interacciones con el agua [Heinze & Koschella, 2005].

La CMC forma disoluciones acuosas viscosas, posee buenas propiedades para formar películas, inocuidad y excelente comportamiento como coloide protector y adhesivo. Estas propiedades, unidas a su bajo coste y facilidad de producción a gran escala han favorecido su amplio uso en aplicaciones industriales, biomédicas, alimenticias y farmacológicas.

Aunque la CMC no es un polímero conductor, este polisacárido ha sido empleado en la construcción de biosensores electroquímicos, y algunos ejemplos de estos se muestran en la **Tabla 5.5**. Esta aplicación se justifica por la acción estabilizante que sobre la estructura de proteínas ejerce este polímero [Villalonga et al., 1999; Villalonga et al., 2003; Villalonga et al., 2000], así como por la posibilidad de unir covalentemente las moléculas de los biorreceptores a su grupos carboximetilo mediante reacciones de conjugación simples [Araque et al., 2014a].

Tabla 5.5. Biosensores electroquímicos basados en electrodos modificados con CMC.

TIPO	ELECTRODO	ANALITO	MÉTODO DETECCIÓN	REFERENCIA
	rGO-CMC-GCE	Vitamina B ₆	EIS, CV	[Cui et al., 2019]
Inmunosensor	APN-CMC-rGO-SPCE	APN	Amperometría	[Arenas et al., 2016]
Enzimático	Lac/PANI/CMC/cellulose/GCE	Catecol	Amperometría	[Fu et al., 2015]
Enzimático	XO/PtNP-PAMAM-MNP/GO-CMC/GCE	Xantina	Amperometría	[Borisova et al., 2016]
Enzimático	Tyr/PAMAM/GO-CMC/GCE	Catecol	Amperometría	[Borisova et al., 2015]
Enzimático	Tyr/CMC-rGO/GCE	Catecol	Amperometría	[Araque et al., 2014a]

rGO: óxido de grafeno reducido; **CMC:** carboximetilcelulosa; **GCE:** electrodo de carbono vitificado; **EIS:** espectroscopia de impedancia electroquímica; **CV:** voltametría cíclica; **EIS:** **APN:** adiponectina; **SPCE:** electrodo de carbono serigrafiado; **Lac:** lacasa; **PANI:** polianilina; **XO:** xantina oxidasa; **PtNP:** nano partículas de platino; **PAMAM:** poliamidoamina; **MNP:** nanopartículas magnéticas; **GO:** óxido de grafeno; **Tyr:** tirosinasa.

Como se ha expresado con anterioridad, en este trabajo se han empleado dendrímeros de PAMAM para la construcción de arquitecturas capa-a-capa sobre la superficie de los electrodos. Los dendrímeros son polímeros sintéticos, monodispersos, de tamaño nanométrico, con una arquitectura tridimensional altamente ramificada [Vögtle et al., 2009]. Estos polímeros pueden sintetizarse mediante métodos divergentes o convergentes, empleando una secuencia de reacciones reiterativa en la que cada paso da lugar a una nueva generación del material, con un aumento de grupos funcionales terminales en la superficie.

En la **Figura 5.12** se representan los principales parámetros estructurales de una molécula de dendrímero.

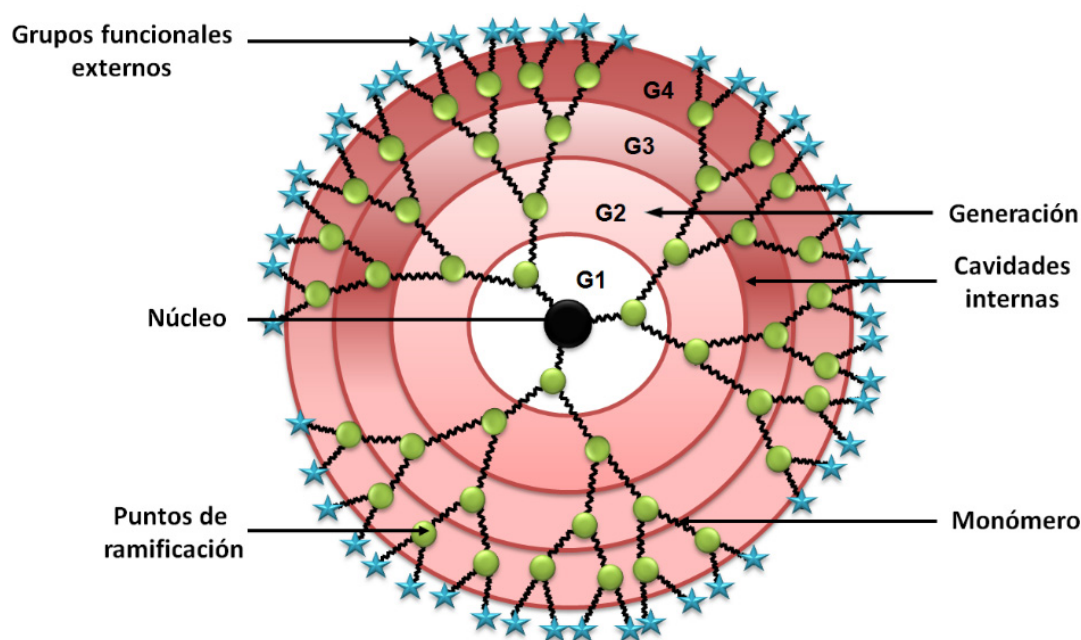


Figura 5.12. Parámetros estructurales de una molécula de dendrímero.

Los dendrímeros son considerados como nanomateriales “blandos”, los cuales poseen una alta homogeneidad estructural, elevada reactividad superficial, alta capacidad para encapsular moléculas en sus cavidades, y pueden ser diseñados con una superficie hidrofílica o hidrofóbica manipulando racionalmente los grupos funcionales externos [Labieniec-Watala & Watala, 2015]. Además, estos grupos externos pueden ser empleados como centros de inmovilización de biorreceptores, lo cual favorece su empleo en la tecnología de los biosensores [Araque et al., 2013; Miodek et al., 2016].

En especial, los dendrímeros de PAMAM (Figura 5.13) han centrado el interés de muchas investigaciones dedicadas a diseñar biosensores electroquímicos de altas prestaciones, algunos de ellos con arquitectura capa-a-capas [Bahadır & Sezgentürk, 2016]. El uso de estos dendrímeros en la tecnología de los biosensores ha sido promovido por la presencia de los grupos amino primarios en su superficie, los cuales confieren una carga neta positiva a este nanomaterial bajo determinadas condiciones de pH, lo que favorece la construcción de estructuras multicapas sobre los electrodos mediante interacciones electrostáticas. Paralelamente, estos grupos amino primarios terminales pueden ser fácilmente transformados con mediadores redox, o empleados para la inmovilización covalente de los biorreceptores [Çevik et al., 2016; Dervisevic et al., 2017a].

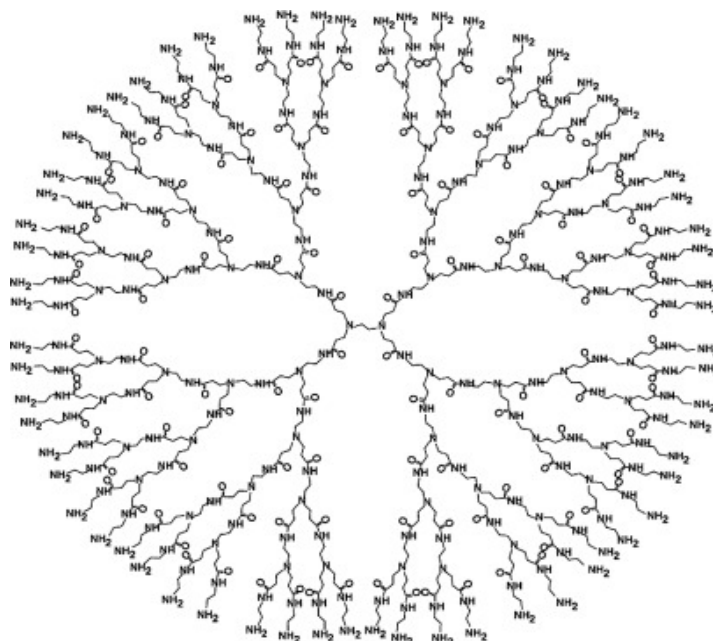


Figura 5.13. Estructura de un dendrímero de PAMAM G4 con núcleo de etilendiamina.

En la **Tabla 5.6** se describen algunos ejemplos de biosensores electroquímicos construidos con dendrímeros de PAMAM.

Tabla 5.6. Biosensores electroquímicos basados en electrodos modificados con dendrímeros de PAMAM.

TIPO	ELECTRODO	ANALITO	MÉTODO DETECCIÓN	REFERENCIA
Enzimático	ChOx&ChEt/Au NPs/rGO-PAMAM-Fc	colesterol	LSV	[Zhu et al., 2019]
Enzimático	GCE-CtRGO-PAMAM-GA-HRP	H ₂ O ₂	Amperometría	[Vusa et al., 2016]
Inmunosensor	GCE/Gr-PAMAM-anti-AFP-HRP	AFP	Amperometría	[Shen et al., 2014]
Inmunosensor	GCE/MWCNTs/IL /Chit/TT PAMAM-AuNPs/anti-PSA/BSA	PSA	DPV, EIS	[Kavosi et al., 2014]
Enzimático	GOx/PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/ GCE	Glucosa	Amperometría	[Araque et al., 2014b]
Inmunosensor	GCE/AuNPs/AET/PAMAM/ATR-BSA/Ab-ATR/Ab-HRP	Atrazina	CV, Amperometría	[Giannetto et al., 2014]

ChOx: colesterol oxidasa; **ChEt**: colesterol esterasa; **AuNP**: nano partículas de oro; **rGO**: óxido de grafeno reducido; **PAMAM**: poliamidoamina; **Fc**: ferroceno; **LSV**: voltamperometría de barrido lineal; **GCE**: electrodo de carbono vitrificado; **CtRGO**: óxido de grafeno reducido de zanahoria; **GA**: glutaraldehído; **HRP**: peroxidasa de rábano picante; **Gr**: grafeno; **AFP**: alfa-fetoproteína; **Ab-AFP**: anti cuerpo de alfa-fetoproteína; **MWCNT**: nanotubos de carbono multipared; **IL**: líquido ionico; **Chit**: quitosano; **TT PAMAM**: PAMAM terminado con tiol; **PSA**: antígeno prostático específico; **BSA**: albúmina de suero bovino; **EIS**: espectroscopía de impedancia electroquímica; **DPV**: voltamperometría diferencial de impulsos; **GOx**: glucosa oxidasa; **PtNPs**: nanopartículas de platino; **AET**: 2-aminoetanotiol; **Ab**: anticuerpo; **ATR**: atrazina; **HRP**: peroxidasa de rábano; **CV**: voltametría cíclica.

5.2.2. Nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 en el diseño de biosensores electroquímicos.

Durante las últimas décadas, los nanomateriales magnéticos han recibido una gran atención por parte de la comunidad científica y la industria, dada sus amplias posibilidades de uso en diversas áreas socioeconómicas [Hedayatnasab et al., 2017; Mohammed et al., 2017]. Estos nanomateriales constituyen la base para la producción de sistemas de almacenamiento de datos de alta capacidad, así como para la construcción de algunos componentes electrónicos miniaturizados. Asimismo, las nanopartículas magnéticas han demostrado ser de gran valor para la biomedicina, donde sus aplicaciones comprenden el diseño de métodos de imagen de resonancia magnética, protocolos de tratamiento hipertérmico, sistema de entrega controlada de medicamentos, e instrumentos y ensayos de análisis clínico [Fathi Karkan et al., 2017; Xiao et al., 2016; Li et al., 2016].

Las nanopartículas magnéticas son también empleadas en la biotecnología y ciencias de la vida para la separación y detección de células, purificación de biomoléculas e inmovilización de enzimas [Vaghari et al., 2016]. Estos nanomateriales han sido también utilizados en aplicaciones medioambientales para la remoción de contaminantes químicos y microbiológicos de fuentes naturales [Gómez-Pastora et al., 2017].

Aunque en la naturaleza existen diversos materiales con propiedades magnéticas, los más comunes son aquellos basados en óxidos de hierro. En este sentido, los más frecuentes son la magnetita (Fe_3O_4), la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y la hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) [Mohammed et al., 2017]. Gracias a los avances en la ingeniería de nanomateriales, actualmente es posible la preparación de estos óxidos a nivel nanométrico, así como de óxidos de hierro dopados con otros metales con mejoradas propiedades magnéticas. Sin embargo, dada sus excelentes propiedades, bajo coste de producción y facilidad de ser preparadas con control de tamaño y morfología a partir de métodos simples, la mayor parte de las investigaciones y aplicaciones se han centrado en las nanopartículas de Fe_3O_4 .

Las nanopartículas de Fe_3O_4 están constituidas por óxido de hierro (III) y (II) con propiedades ferromagnéticas, que cristalizan en el sistema cúbico centrado en las caras característico de las espinelas inversas (Figura 5.14). En estos cristales, el Fe (III) se presenta con configuración tetrahédrica y octahédrica, mientras que el Fe (II) solo presenta una configuración octahédrica [Friák et al., 2007].

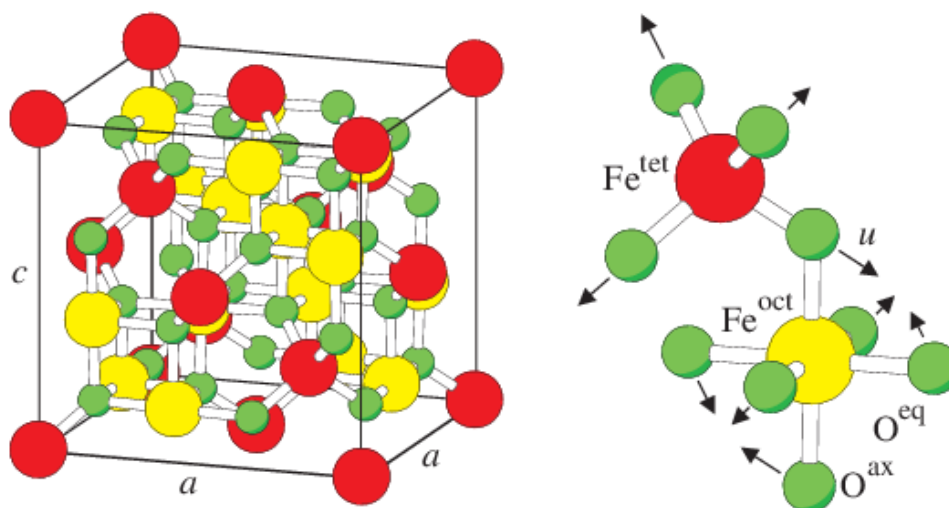


Figura 5.14. Estructura del cristal cúbico centrado en las caras y disposición de los átomos en la magnetita Fe_3O_4 (tet: tetrahédrico, oct: octahédrico, eq: ecuatorial, ax: axial) [Friák et al., 2007].

Estos nanomateriales pueden prepararse mediante métodos físicos o químicos, siendo estos últimos los más adecuados para obtener productos con menor dispersión y tamaño controlado. En este sentido, las estrategias más comunes para la preparación de estos nanomateriales por vía química se basan en la coprecipitación de sales de Fe (II) y Fe (III), reacciones sol-gel o en microemulsiones, electrodeposición, síntesis hidrotérmica, sonólisis, descomposición térmica de precursores organometálicos, reacciones en fase vapor o en aerosoles, y síntesis con inyección en flujo [Mohammed et al., 2017].

Para tamaños inferiores a 15 nm, para los cuales cada nanopartícula se comporta como un dominio magnético individual, estos nanomateriales presentan propiedades superparamagnéticas [Lu et al., 2007]. De esta forma, las partículas son magnetizadas solo en presencia de un campo magnético externo, mientras que en su ausencia la magnetización media de las nanopartículas es cero. Esta importante propiedad ha favorecido el empleo de las nanopartículas de Fe_3O_4 en muchas de las aplicaciones antes citadas, así como en la construcción de biosensores electroquímicos.

En este sentido, debe destacarse que las nanopartículas de Fe_3O_4 son fundamentalmente empleadas en la tecnología de los biosensores electroquímicos como elementos de transducción y como materiales de captura en sensores de afinidad [Haun et al., 2010]. Su uso en este campo está basado tanto en las propiedades superparamagnéticas como en las siguientes características, las cuales son inferiores o no son presentadas por las micropartículas magnéticas de latex actualmente en el mercado [Rocha-Santos, 2014]:

- Modulación de sus propiedades magnéticas de acuerdo al tamaño, morfología y agregación de las nanopartículas.
- Fácil preparación con tamaño, morfología y grado de dispersión controlados mediante métodos químicos relativamente simples y poco costosos.
- Alta relación entre área superficial y volumen, lo cual favorece un alto grado de inmovilización de biorreceptores.
- Actividad electrocatalítica frente a varios compuestos con interés analítico. En este punto destaca la capacidad de estas nanopartículas de actuar como nanoenzimas artificiales frente al H_2O_2 , con actividad tipo peroxidasa [Wei & Wang, 2008].
- Fácil modificación química superficial o recubrimiento con otros materiales para mejorar sus propiedades de compatibilidad, estabilidad y capacidad de inmovilización de biorreceptores.
- Radio y volumen hidrodinámico pequeños, que favorece su integración en sistemas microfluídicos.

Como ejemplos de uso de estos nanomateriales en la tecnología de los biosensores electroquímicos, en las **Tablas 5.7 y 5.8** se describen dispositivos donde estas nanopartículas o sus derivados se emplean como elementos de transducción y captura, respectivamente.

Tabla 5.7. Biosensores electroquímicos basados en electrodos modificados con nanopartículas de Fe_3O_4 .

TIPO	ELECTRODO	ANALITO	MÉTODO DETECCIÓN	REFERENCIA
Genosensor	ds-DNA/p(L-Cys)/ Fe_3O_4 NPs-GO/CPE	A,G	CV, DPV	[Arvand et al., 2018]
Enzimático	Fe_3O_4 /rGO	Glucosa	Amperometría	[Pakapongpan , Poo-arporn, 2017]
Enzimático	(GOx/PVA- Fe_3O_4 /Sn	Glucosa	EIS, CV	[Sanaeifar et al., 2017]
Enzimático	LOx/ Fe_3O_4 /PB/CPE	Ácido láctico	Amperometría	[Kaçari et al., 2016]
Enzimático	Nf/GOx/CA-IONPs/ITO	Glucosa	CV	[Nor et al., 2016]
Enzimático	Chs/ Fe_3O_4 /rGO/GOx/GCE	Glucosa	Amperometría	[Zhang et al., 2015a]
Inmunosensor	SPCE/GrS/ GMP/BSA-CLB/anti-CLB/ Fe_3O_4 -Au NP	CLB	DPV	[Yang et al., 2014]

dsDNA: ácido desoxirribonucleico bicatenario; **p(L-Cys):** poli L- cisteína; **Fe_3O_4 NP:** nanopartículas de magnetita; **GO:** óxido de grafeno; **CPE:** electrodo de pasta de carbono; **A:** adenina; **G:** guanina; **DPV:** voltamperometría diferencial de impulsos; **CV:** voltametría cíclica; **rGO:** óxido grafeno reducido; **GOx:** glucosa oxidasa; **PVA:** polialcohol vinílico; **EIS:** espectroscopía de impedancia electroquímica; **LOx:** lactato oxidasa; **PB:** azul de Prusia; **Nf:** nafion; **CA:** ácido cítrico; **IONP:** nanopartículas de óxido de hierro; **ITO:** óxido de estaño e indio; **Chs:** quitosano; **GCE:** electrodo de carbono vitrificado; **SPCE:** electrodo de carbono serigrafiado; **GrS:** hojas de grafeno; **GMP:** Partículas de pOro-Magnéticas, nanopartículas de oro-magnetita; **BSA:** albúmina de suero bovino; **CLB:** clenbuterol; **anti-CLB:** anticuerpo clenbuterol de conejo.

Tabla 5.8. Biosensores electroquímicos basados en el uso de nanopartículas de Fe_3O_4 como elementos de captura.

TIPO	ELECTRODO	ANALITO	MÉTODO DETECCIÓN	REFERENCIA
Inmunosensor	$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ /ConA/SPE	<i>Brettanomyces</i> ; contenido total de levadura en vino	Amperometría	[Villalonga et al., 2019]
Genosensor	GCE/MWCNTs/ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ /DNA; $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{Au}$ /DNA/GCE/MWCNTs	Oligonucleótido diana	DPV	[Mahmoudi-Badiki et al., 2017]
Enzimático	SOx / $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ -Cys-FA/CPE	Contenido de sulfito en vinos	Amperometría	[Sroysee et al., 2016]
Enzimático	$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{pDA}$ /HRP/GCE	H_2O_2	Amperometría	[Martin et al., 2014]

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$: nanopartículas de magnetita recubiertas de sílice; **ConA**: concanavalina A; **SPE**: electrodo serigrafiado; **GCE**: electrodo de carbono vitrificado; **MWCNT**: nanotubos de carbono multipared; **$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$** : nanopartículas de magnetita, recubiertas de oro; **DNA**: ácido desoxirribonucleico; **$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{Au}$** : nanopartículas de γ -maghemita recubiertas de oro; **Cys**: cisteína; **FA**: ácido fólico; **pDA**: polydopamina; **HRP**: peroxidasa de rábano; **DPV**: voltamperometría diferencial de impulsos; **SOx**: sulfito oxidasa; **$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ -Cys-FA**: núcleo de nanopartículas de magnetita recubierto de oro, encerrado dentro de una cubierta de cisteína de ácido fólico conjugado; **CPE**: electrodo de pasta de carbono.

5.3. Biosensores electroquímicos para el análisis de alimentos

5.3.1. Biosensores enzimáticos para xantina

La xantina (3,7-dihidropurina-2,6-diona) es una base púrica que se genera en los tejidos musculares de los animales como resultado del catabolismo de la guanina y la adenosina-5-fosfato (**Figura 5.15**). En general, la concentración de este compuesto en plasma y orina es bajo, ya que es rápidamente transformada en ácido úrico mediante procesos enzimáticos.

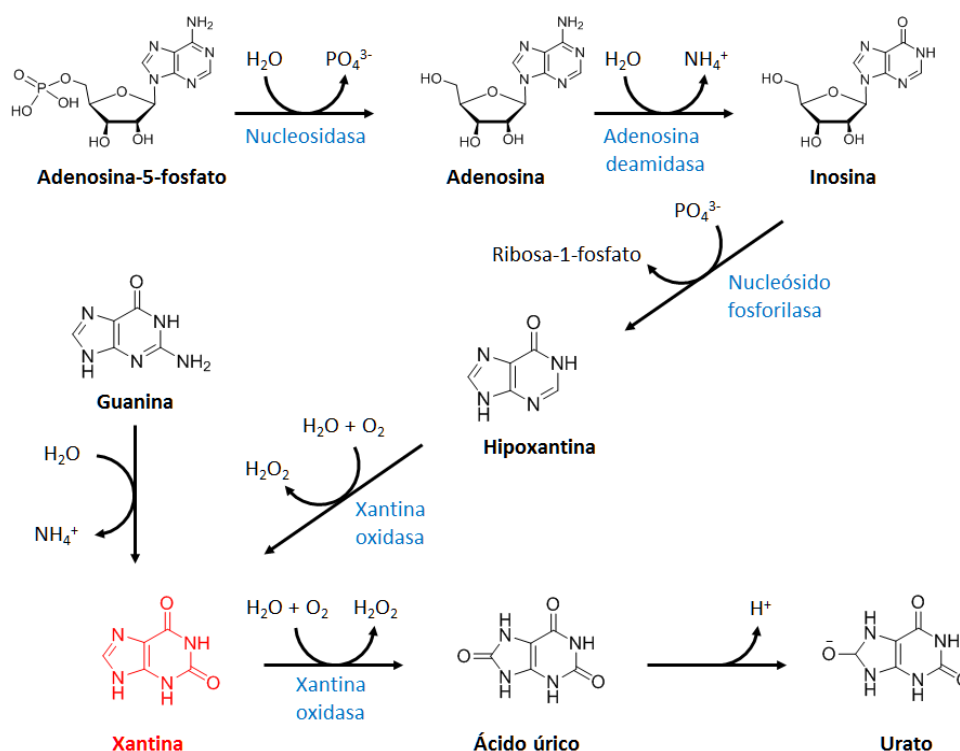


Figura 5.15. Metabolismo de xantina a partir de guanina y adenosina-5-fosfato [Tymoczko et al., 2013].

La acumulación de xantina en el organismo, expresada clínicamente en concentraciones anormalmente altas de xantina en el plasma y la orina, puede causar la muerte. Este fenómeno, muchas veces originado por el consumo de alimentos ricos en este compuesto, contribuye a la desregulación del metabolismo de esta base púrica causando problemas fisiológicos serios como la gota, xantinuria, hiperuricemia, preeclampsia y deficiencia renal, así como complicaciones cardiovasculares [Harrison, 2004; Aksoy et al., 2019]. Por este motivo, la xantina constituye un biomarcador importante para detectar estas enfermedades en estados iniciales de desarrollo.

Asimismo, la determinación de xantina en alimentos es de vital importancia para esta industria, ya que concentraciones elevadas de este compuesto están asociadas al deterioro del pescado y la carne, siendo por tanto un indicador efectivo del índice de frescura de estos productos [Johnson et al., 2019].

Para la determinación de la xantina se emplean generalmente métodos de análisis enzimáticos, colorimétricos, HPLC, electroforesis capilar y espectrometría de masas [Pundir & Devi, 2014]. Paralelamente, un gran número de investigaciones se han centrado en el desarrollo de dispositivos bioelectroanalíticos basados en la enzima xantina oxidasa [Sharma et al., 2015].

La xantina oxidasa (EC 1.17.3.2) es una enzima homodimérica, donde cada unidad posee un peso molecular de 270 kDa y actúa como unidad catalítica independiente. Cada unidad monomérica contiene un cofactor de molibdopterina, dos centros ferrosulfurados de tipo [2Fe-2S] espectroscópicamente diferentes y una molécula de dinucleótido de flavinadenina (FAD). La oxidación del sustrato ocurre en el centro de molibdopterina, y los electrones son posteriormente distribuidos a los otros centros mediante transferencia electrónica intramolecular [Enroth et al., 2000].

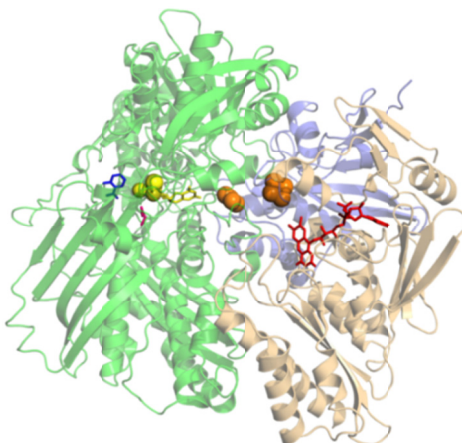


Figura 5.16. Estructura monomérica de la xantina oxidasa, representando amarillo el cofactor de molibdopterina, en naranja los centros ferrosulfurados y en rojo la molécula de FAD.

La xantina oxidasa cataliza la oxidación de la hipoxantina a xantina, así como la posterior transformación de esta en ácido úrico, como se muestra en la **Figura 5.15**. A partir de estas transformaciones se genera H_2O_2 , cuya oxidación posterior sobre la superficie del electrodo puede ser determinada mediante diferentes técnicas electroanalíticas. En la **Tabla 5.9** se muestran las propiedades analíticas de biosensores electroquímicos para xantina basados en esta enzima.

Tabla 5.9. Biosensores electroquímicos enzimáticos para xantina.

Electrodo	Rango lineal	Sensibilidad	LD	Referencia
XOx/PVA-AWP (1:2)	1.0 - 75 μM	0.272 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	2.17 μM	[Becker et al., 2019]
(XOx -PDDA-MWCNTs-Gr) ³ -MWCNTs-Gr-SPCE	5 - 50 μM	0.241 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	4.40 μM	[Si et al., 2018]
XOx /Chi-PPy/AuNP/GCE	1-200 μM	1.4 nA/mM	0,25 μM	[Dervisevic et al., 2017]
XOx / c-MWCNTs/ Fe ₃ O ₄ NPs/TCNQ/Chi/ PVA /Nf/GCE	1.9 - 230 μM	25.07 $\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$	0.20 μM	[Dalkiran et al., 2017]
XOx / c-MWCNTs/ Co ₃ O ₄ NPs/TCNQ/CHI/ PVA /Nf/GCE	1.9 - 120 μM	13.24 $\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$	0.36 μM	[Dalkiran et al., 2017]
PGE/DTP-alkyl-NH ₂ /GA/ XOx	0.3 - 25 μM	140 mA/M ⁻¹	0.074 μM	[Dervisevic et al., 2016]
XOx/mSiNSs/GCE	1.5 - 212 μM		0.28 μM	[Saadaoui et al., 2016]
XOx/PtNP-PAMAM-MNP/GO-CMC/GCE	0.05 - 12 μM	9.9 mA/M	0,013 μM	[Borisova et al., 2016]
XOx/P(GMA-co-VFc)/ MWCNT PGE	2 - 28 μM	16 mA/M	0,12 μM	[Dervisevic et al., 2015]
XOx/NanoFe ₃ O ₄ /Au nanobio electrode	0.4 - 2.4 nM	4.94 $\mu\text{A}/\text{nM}$	2.5 pM	[Thandavan et al., 2013]

XOx: xantina oxidasa; **PVA-AWP:** fotopolímero soluble de alcohol polivinilo ramificado con grupos de azida; **PDDA:** polialcohol vinílico; **MWCNT:** nanotubo de carbono de pared múltiple; **Gr:** grafeno; **SPCE:** electrodo serigrafado de carbono; **Chi:** quitosano; **PPy:** polipirrol; **AuNP:** nanopartículas de oro; **GCE:** electrodo de carbono vitrificado; **c-MWCNT:** nanotubo de carbono carboxilado multipared; **TCNQ:** 7,7',8,8'- tetracianoquinodimetano; **PVA:** poli(vinil alcohol); **Nf:** nafion; **PGE:** electrodo de grafito lápiz; **DTP-alkyl-NH₂/GA:** 10-(4H-ditieno[3,2-b:2',3'-d]pirrol-4-il)decan-1-amine; **GA:** glutaraldehído; **mSiNSs:** nanoesferas de sílice mesoporosa; **PtNP:** nanopartículas de platino; **PAMAM:** poliamidoamina; **GO:** óxido de grafeno; **CMC:** carboximetilcellulosa; **P(GMA-co-VFc):** poli (metacrilato de glicidilo-co-vinilferroceno).

5.3.2. Biosensores enzimáticos para catecol

Los fenoles o compuestos fenólicos son compuestos orgánicos cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, o sea, un anillo aromático unido al menos a un grupo funcional hidroxilo. Estos compuestos se encuentran ampliamente presentes en el reino vegetal, pues son producidos por las plantas como metabolitos secundarios para ejercer diversas funciones [Alu'datt et al., 2017]. Entre ellas, los compuestos fenólicos pueden ejercer una función estructural en las plantas, actuar como protectores frente a las radiaciones ultravioleta, formar los pigmentos naturales, intervenir como reguladores de interacciones planta-microorganismos, y estar implicados en mecanismos naturales de defensa frente a patógenos [Balasundram et al., 2006]. Algunos compuestos fenólicos tienen efectos alelopáticos y de atracción de polinizadores, y pueden desempeñar un importante papel en la tolerancia a diferentes condiciones de estrés [Chalker-Scott & Fuchigami, 2018].

Estos compuestos constituyen asimismo uno de los grandes grupos de micronutrientes de la dieta humana y animal. Los compuestos fenólicos se oxidan con facilidad, lo cual les confiere propiedades antioxidantes beneficiosas para el organismo

humano, pues contrarrestan la oxidación producida por radicales libres involucrados en el estrés oxidativo celular [Rice-Evans et al., 1997; Huang et al., 2009; Croft et al., 2018].

Por otra parte, muchos compuestos fenólicos empleados en la industria y la agricultura son altamente tóxicos para el hombre, los animales y el medioambiente. En este grupo se encuentra el catecol (1,2-dihidroxibenceno), compuesto que tras exposición oral o subcutánea prolongada puede causar daños severos en diferentes órganos como el hígado, los pulmones, riñones y tracto urinario [Robertson et al., 1991; Hasegawa et al., 2006; Barreto et al., 2009].

Por estos motivos, tanto la determinación del contenido total de fenoles en alimentos, así como la posible presencia de catecol en estos productos es de gran importancia en la industria alimenticia. En general, el contenido total de fenoles es determinado mediante ensayo colorimétrico empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu [Jennings, 1981]. Por otra parte, la determinación de catecol se realiza mediante métodos espectrofotométricos, cromatográficos y electroforéticos [Khoddami et al., 2013]. Sin embargo, la posibilidad de construir un dispositivo analítico para la rápida y precisa determinación de este difenol, así como del contenido total de compuestos fenólicos en alimentos ha motivado el desarrollo de muchas investigaciones orientadas al diseño de dispositivos biosensores para este analito.

Los biosensores electroquímicos desarrollados para estos fines emplean fundamentalmente las enzimas lacasa, tirosinasa y peroxidasa como elemento de reconocimiento analítico [Portaccio et al., 2006]. En el presente trabajo de tesis se ha empleado la tirosinasa como enzimas redox para el diseño de una plataforma biosensora nanoestructurada para este analito.

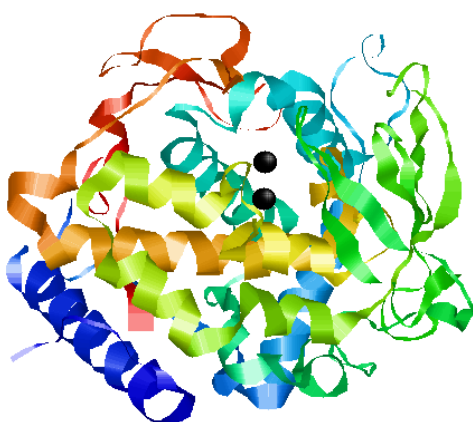


Figura 5.17. Estructura monomérica de la tirosinasa, representando en negro los átomos de cobre.

La tirosinasa o polifenoloxidasa (EC 1.14.18.1) es una metaloenzima redox que contiene un centro de cobre binuclear tipo 3 dentro de su sitio activo, donde cada átomo del metal está formando un complejo con 3 residuos de histidina [Decker et al., 2006; Ismaya et al., 2011]. Esta enzima se encuentra muy distribuida en la naturaleza, siendo producida por bacterias, hongos, plantas y animales [Seo et al., 2003]. En la **Figura 5.17** se representa la estructura monomérica de esta enzima.

La tirosinasa cataliza la oxidación de fenoles, pero su especificidad es mayor frente a los monofenoles con una posición orto libre y los orto-difenoles. En este sentido, la tirosinasa de hongos empleada en nuestro trabajo presenta una alta especificidad por el catecol, por lo cual ha sido clasificada como una catecol oxidasa [Espín et al., 2000]. En la **Figura 5.18** se presenta la reacción de transformación de catecol catalizada por la enzima tirosinasa.

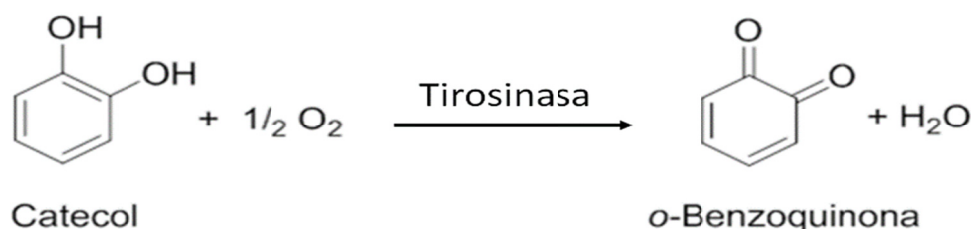


Figura 5.18. Reacción de oxidación de catecol en presencia de tirosinasa.

La oxidación de catecol con oxígeno en presencia de tirosinasa produce o-benzoquinona y agua [Sánchez-Ferrer et al., 1995]. Esta o-quinona puede reducirse sobre la superficie del electrodo, dando como producto el catecol de partida. Este proceso de “reciclaje” del sustrato permite la construcción de biosensores de tirosinasa altamente sensibles y con muy bajos límites de detección [Shan et al., 2003]. Por tal motivo, esta enzima ha sido ampliamente empleada para la construcción de biosensores altamente sensibles para catecol. En la **Tabla 5.10** se reportan las propiedades analíticas de biosensores electroquímicos de tirosinasa para este analito.

Tabla 5.10. Biosensores electroquímicos para catecol basados en la enzima tirosinasa.

Electrodo	Rango lineal	Sensibilidad	LD	Referencia
CTAB/Glu/PPO/PANI/Tyr/SPCE	0.5 - 120 μ M		88.1 nM	[Sasikumar et al., 2018]
MWCNTs-TiO ₂ /Tyr	0.2 - 2.7 mM	85.79 mA/M	0.014 μ M	[Fathy et al., 2018]
SPEs/MWCNTs/AuNWs/Tyr	0.5 - 42 μ M		0.027 μ M	[Kurbanoglu & Ozkan., 2017]
Tyr/Dex-Au-Sil-rGO/GCE	100 pM - 120 nM	45.9 A/M	40 pM	[Boujakhrou et al., 2015]
Tyr/PAMAM/GO-CMC/GCE	0.002 - 0.4 μ M	630 μ A/ μ M	0.9 nM	[Borisova et al., 2015]
Tyr/rGO-CMC/GCE	0.02 - 56 μ M	270 μ A/ μ M	0.2 nM	[Araque et al., 2014a]

CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio; **Glu:** glucosa; **PPO:** polifenol oxidasa; **PANI:** polianilina; **Tyr:** tirosinasa; **SPCE:** electrodo serigrafiado de carbono; **SPE:** electrodo serigrafiado; **MWCNTs:** nanotubos de carbono de pared múltiple; **Dex:** dextrano; **Sil:** (3-mercaptopropilo) trimetoxisilano; **Sil-GO:** óxido de grafeno silanizado; **AuNWs:** nanohilos de oro; **PAMAM:** poliamidoamina; **CMC:** carboximetilcelulosa; **MCN:** nitrato de carbono mesoporoso; **rGO:** óxido de grafeno reducido; **Gr:** grafeno.

5.3.3. Biosensores electroquímicos para levaduras en vinos

El vino es un producto que se obtiene a partir de la fermentación de la uva, empleando fundamentalmente la levadura *Saccharomyces cerevisiae* [Wei et al., 2019]. El vino se elabora a partir de materia prima sin tratar, se consume crudo y tiene un tiempo de almacenamiento prolongado, con el riesgo de sufrir contaminaciones microbiológicas alterantes de su aroma y sabor. La microflora presente en la uva se mantiene al comenzar la vinificación, de tal manera que las levaduras *S. cerevisiae* autóctonas participan, junto con las añadidas en el cultivo iniciador, en la transformación del mosto en vino. Sin embargo, junto a las levaduras beneficiosas también permanecen microorganismos que pueden perjudicar al vino.

El etanol producido durante la fermentación alcohólica impide el crecimiento de casi todos estos microorganismos indeseados. Sin embargo, la levadura *Brettanomyces bruxellensis* es capaz de resistir a estas condiciones, siendo la causa de las mayores pérdidas en vinos envejecidos en barrica [Schifferdecker et al., 2014; Guzzon et al., 2018]. Aunque la *S. cerevisiae* y *B. bruxellensis* poseen metabolismos similares, muy adaptados a las condiciones de vinificación, la *B. bruxellensis* es capaz de emplear una mayor diversidad de azúcares para su nutrición, incluyendo trealosa y celobiosa [Blomqvist et al., 2010]. Asimismo, esta levadura puede emplear nitrato como fuente de nitrógeno para su crecimiento [De Barros Pita et al., 2011; Galafassi et al., 2013]. También, esta levadura es altamente resistente a concentraciones altas de etanol, SO₂ y condiciones de acidez.

La contaminación de vinos con *B. bruxellensis* afecta las propiedades organolépticas de esta bebida, debido fundamentalmente a los etilfenoles derivados su metabolismo. Entre estos, los más importantes desde un punto de vista de afectación al vino son el 4-etilfenol, 4-etilguaiacol y 4-etilcatecol [Oelofse et al., 2009]. Esta levadura produce también 2-etiltetrahidropiridina, 2-acetiltetrahidropiridina y ácido isovalérico, las cuales afectan el sabor de los vinos tintos aún a muy bajas concentraciones [Suárez et al., 2007; Romano et al., 2008; Madsen et al., 2016].

Por otra parte, aunque la levadura *S. cerevisiae* es la especie predominante en el proceso de producción del vino, debe ser eliminada tras la fermentación para evitar su crecimiento no controlado durante el llamado estado de “re-fermentación”. En este sentido, la presencia de esta levadura en esta etapa tardía del proceso pudiera originar cambios indeseados en la composición del producto, con la consiguiente afectación de sus propiedades organolépticas [Martorell et al., 2005]. Este hecho es significativamente importante en los vinos dulces.

Por tal motivo, la determinación altamente sensible y específica de *B. bruxellensis* y *S. cerevisiae* en muestras de vinos es de importancia vital para esta industria. Estos análisis se realizan fundamentalmente mediante métodos tradicionales de cultivo, los cuales como se explicó anteriormente, no son totalmente eficaces dado el tiempo requerido para su realización. Por tal motivo, el desarrollo de dispositivos más simples, que requieran menores tiempos de análisis, y que sean capaces de proporcionar información analítica reproducible, específica y sensible sobre el contenido de estas levaduras es una necesidad para el sector del vino.

En las **Tablas 5.11** y **5.12** se muestran las propiedades analíticas de biosensores electroquímicos desarrollados para estas dos levaduras.

Tabla 5.11. Biosensores electroquímicos para *B. bruxellensis*.

Electrodo	Intervalo lineal	LD	Referencia
MNP/Abrett-aB/SPE	10 - 10 ⁶ UFC/mL	6 UFC/mL	[Villalonga et al., 2019]
IDE de oro	—	10 ² UFC/mL	[Tubía et al., 2018a]
IDE /ABrett-aB	—	10 ² UFC/mL	[Tubía et al., 2018b]
AuNP-rGO /antiBrett /Con A-HRP	10 ² - 10 ⁶ UFC/mL	56 UFC/mL	[Borisova et al., 2017]
CuNP, WO ₃ NP, CoPc, Bi ₂ O ₃ NP; PPy	0 - 25 mg/L	—	[González-Calabuig & Valle, 2017]
LSPR /Au -tDNA		0.1 ng/μL	[Manzano et al., 2016]

MNP: nanopartículas magnéticas; **aB:** anticuerpo; **IDE:** electrodo inter digitado, **Con A:** concanavalina A; **HRP:** peroxidasa de rábano picante; **PPy:** polipirrol; **CoPc** : cobalto-ftalocianina; **LSPR:** resonancia de plasmón superficial localizada inducida por la luz; **tDNA:** ácido desoxirribonucleico modificado con tiol.

Tabla 5.12. Biosensores electroquímicos para *S. cerevisiae*.

Electrodo	Intervalo Lineal	LD	Referencia
MNP/ compl. Con A-HRP	10 - 10 ⁶ UFC/mL	10 UFC/mL	[Borisova et al., 2018]
GE- ácido 3-mercaptopropiónico	10 ² - 10 ⁸ UFC/mL	10 ² UFC/mL	[Chen et al., 2005]
TCN/GCE	10 ² - 10 ⁸ UFC/mL	2.5 × 10 ⁴ UFC/mL	[Han et al., 2000]

Con A: concanavalina A; **HRP:** peroxidasa de rábano picante; **MNP:** nanopartículas magnéticas; **GE:** electrodo de oro modificado; **MPA:** 3-mercaptopropiónico; **TCN:** tetraciclina; **GCE:** electrodo de carbono vitrificado.

6.

Objetivos

El **objetivo principal** de esta Tesis es la construcción y caracterización de plataformas de biodetección electroquímica, basadas en novedosos nanomateriales híbridos, y su aplicación en el análisis de alimentos.

Para alcanzar este objetivo principal, este trabajo abarca los siguientes **objetivos específicos**:

- Preparación y caracterización de nuevos nanomateriales híbridos basados en óxido de grafeno con nanopartículas metálicas y polímeros.
- Diseño y construcción de biosensores enzimáticos nanoestructurados para la determinación de catecol y xantina.
- Diseño y ensamblaje de nuevos inmunosensores electroquímicos para *B. bruxellensis*, *S. cerevisiae* y determinación de levadura total.
- Evaluación de las propiedades analíticas y de estabilidad de las plataformas biosensoras, y su aplicación para el análisis de muestras de alimentos.

7.

Publicaciones Científicas

ELECTROANALYSIS 27, 2015, 2131-2138

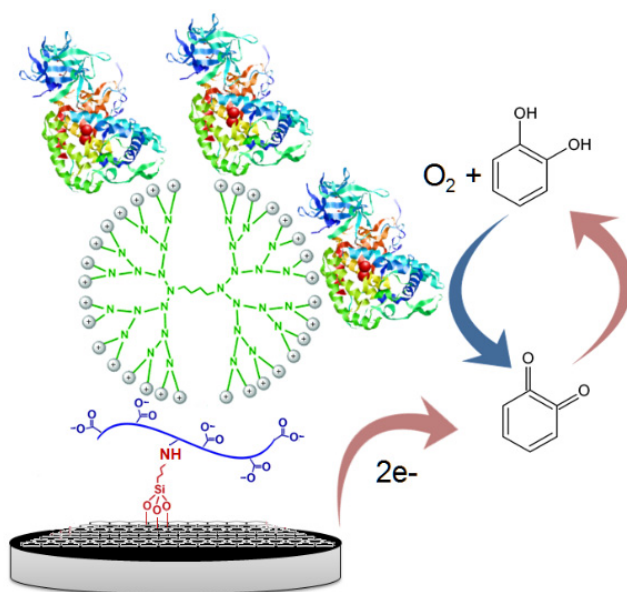
**A layer-by-layer biosensing architecture based on
polyamidoamine dendrimer and carboxymethylcellulose-
modified graphene oxide**

A LAYER-BY-LAYER BIOSENSING ARCHITECTURE BASED ON POLYAMIDOAMINE DENDRIMER AND CARBOXYMETHYLCELLULOSE-MODIFIED GRAPHENE OXIDE

Boryana Borisova, Javier Ramos, Paula Díez, Alfredo Sánchez, Concepción Parrado, Elena Araque, Reynaldo Villalonga,* and Jose M. Pingarrón*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid 28040 - Madrid Spain

*e-mail: rvillalonga@quim.ucm.es, pingarro@quim.ucm.es



ABSTRACT

A novel nanostructured architecture for the construction of electrochemical enzyme biosensors is here described. It implies the electrostatic layer-by-layer assembly of four-generation ethylenediamine core polyamidoamine G-4 dendrimers on glassy carbon electrodes coated with a graphene oxide-carboxymethylcellulose hybrid nanomaterial. This modified surface was further employed for the covalent immobilization of the model enzyme tyrosinase through a glutaraldehyde-mediated cross-linking. The prepared enzyme electrode allowed the amperometric detection of catechol in the 2 - 400 nM range. The biosensor showed excellent analytical performance with high sensitivity of 6.3 A/M and low detection limit of 0.9 nM. The enzyme electrode retained over 93 % of the initial activity after 40 days at 4 °C.

Keywords: Graphene, Biosensor, Dendrimer, Hybrid nanomaterial, Tyrosinase

1. INTRODUCTION

During the last decades, electroanalytical chemistry has been noticeably empowered with the advances in nanoscience and nanotechnology [1]. In this sense, the development of new nanopatterning and nanoimprint approaches allowed the construction of highly miniaturized and reproducible electrochemical sensing surface with exceptional characteristics [2]. However, the higher impact on the design of novel and more reliable electrochemical methods of analysis has been promoted by the fast evolution in nanomaterial chemistry [3].

Nanomaterials have unique functional properties which are modulated by their composition, physico-chemical and structural characteristics, but also by their surface-to volume ratio properties. They can be tailor made prepared with different size and morphology, and rationally functionalized to favor easy assembly of chemical receptor or immobilization of biomolecular receptors [4]. Nanomaterials can be also combined or modified with other materials allowing the development of a great variety of composite nanomaterials and nanohybrids with new structural and functional characteristics [5].

Graphene and graphene oxide (GO) are among the nanomaterials more widely employed as transduction elements in electroanalytical chemistry during the last years due to their relevant electroconductive properties, allowing fast electron transfer reactions on electrode surfaces [6]. These 2D nanomaterials show electrocatalytic

properties favoring the assembly of highly sensitive electroanalytical devices able to work at relative low potentials for the specific detection of target analytes. Graphene and GO can be also easily transformed to advanced hybrid derivatives by proper chemical transformation or combination with other nanostructured or polymeric materials, offering the possibility to design a wide variety of original three-dimensional nanoarchitectures at the electrode surface. In this regard, a large number of electrochemical biosensors based on graphene and graphene oxide modified with other nanomaterials such as metal and metaloxide nanoparticles, nanowires, carbon nanotubes and quantum dots have been described recently [6c,7].

However, there are relevant advantages associated with the preparation of functional polymer-based nanohybrids of graphene and GO such as the increased colloidal stability and biocompatibility. From an electroanalytical point of view, modification of these nanomaterials with polyfunctionalized macromolecules allows the introduction of a high density of chemical groups able to be employed as grafting points for the covalent attachment of specific chemical or biological receptors. There are many examples related to the application of functional polymer-modified graphene derivatives in electrochemical sensor and biosensor technology. In general, cationic polymers such as chitosan, polyaniline, polylysine, polyethylenimine, branched polyethylene glycol-amine and polyamidoamine dendrimers have been the most widely employed to design graphene nanohybrid for electroanalytical purposes [8].

Recently we described the synthesis of an polyanionic water-soluble reduced GO (rGO) derivative by covalent grafting with carboxymethyl cellulose (rGO-CMC) [9]. This nanohybrid was successfully employed as transduction element for the construction of an electrochemical enzyme biosensor. As an advance in the design of a more sophisticated 3D nanoassembly for electrochemical transduction, here we describe the layering of glassy carbon electrode coated with rGO-CMC with four-generation ethylenediamine core polyamidoamine G-4 dendrimers (PAMAM). This nanostructured surface was further evaluated as support for the construction of electrochemical enzyme biosensors by assembling covalently a tyrosinase-based protein layer.

2. EXPERIMENTAL

2.1 Materials

Tyrosinase (Tyr, EC 1.14.18.1, 5370 U/mg) and glutaraldehyde were acquired from Sigma-Aldrich Co. (USA). PAMAM dendrimer was purchased from Dendritech, Inc.(USA). Graphene oxide was acquired from NanoInnova Technologies (Spain). Low viscosity carboxymethylcellulose sodium salt (CMC, $M_v = 2.96 \times 10^4$, substitution degree = 0.7) was obtained from BDH (Poole, UK). All other chemicals were analytical grade.

2.2 Apparatus, Electrodes and Solutions

All electrochemical measurements were performed by using a conventional three-electrode system, in which the working electrode was a glassy carbon electrode (GCE, 3.0 mm diameter) modified with the rGO-CMC/PAMAM layer-by-layer assembly and the immobilized enzyme. An Ag/AgCl/KCl (3 M) and a Pt wire were used as reference and counter electrodes, respectively. Cyclic voltammetry was performed using a FRA2 μ Autolab Type III potentiostat/galvanostat and the data were acquired using GPES Ver. 4.9 (Metrohm Autolab B. V., The Netherlands). Amperometric measurements in stirred solutions at 300 rpm were carried out with an ultrasensitive Inbea potentiostat (Inbea Biosensores S. L., Spain). The measurements with the biosensor were carried out at 25 °C in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.5 (working volume 10 mL). 2.0 μ M catechol solutions in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, were freshly prepared.

The surface morphology of the modified electrodes was characterized by high resolution field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) using a JEOL JSM-6335F microscope (JEOL Ltd., Japan).

2.3 Preparation of the Enzyme Electrode

rGO-CMC was prepared as previously described [9]. This synthetic protocol involved grafting of GO with (3-aminopropyl) triethoxysilane and the further covalent attachment of periodate-oxidized CMC [10], through a reductive alkylation process with NaBH_4 .

To assemble the nanostructured layer-by-layer architecture, a bare GCE was first polished to mirror-like surface with alumina powder (0.3 μm), rinsed thoroughly with double distilled water, successively washed with double distilled water, anhydrous ethanol and acetone in an ultrasonic bath, and dried under N_2 before use. Coating of

the electrode with the rGO-based nanohybrid was accomplished by depositing two 10 μL aliquots of a 0.5 mg/mL aqueous dispersion of rGO-CMC on the electrode surface and allowing drying. Ten microliters of a 0.5 mg/mL aqueous dispersion of PAMAM was further deposited on the coated surface and the electrode was kept at 4°C in wet conditions during 1 h. The modified electrode was then washed with double distilled water and dried under N_2 . Tyr was further immobilized on the modified electrode by dropping 20 μL of 10 mg/mL enzyme solution in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, and mixed with 4 μL of 25 % (v/v) glutaraldehyde. The electrode was kept at 4 °C for 1 h, then washed several times with cold 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, and finally stored in refrigerator until use.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The strategy employed to assemble the layer-by-layer architecture of rGO-CMC nanohybrid and PAMAM on GCE is schematically displayed in **Figure 1**. The first layer consisted in a highly hydrophilic and negatively charged hybrid nanomaterial that was prepared by grafting the anionic polysaccharide CMC to the basal plane of an amino-enriched GO derivative [9]. This nanostructured layer allows the further assembly of PAMAM, a cationic dendrimer, through electrostatic interactions. It has been demonstrated previously that such kind of polyelectrolyte complexes are highly stable due to the formation of multipoint salt bridges between the opposite charged polymer chains [11].

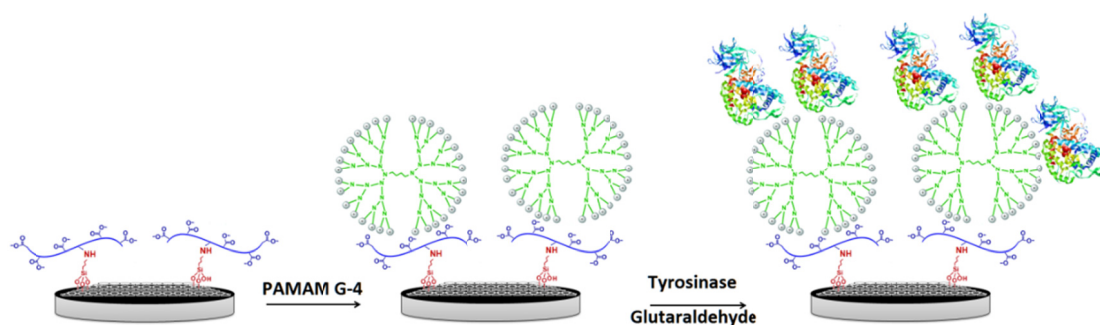


Figure 1. Scheme displaying the steps involved in the preparation of the layer-by-layer ensemble of rGO-CMC, PAMAM and Tyr on GCE.

The rational of this assembly was based on the use of rGO-CMC as conductive transducer element with polyanionic characteristics, allowing formation of polyelectrostatic interactions with PAMAM dendrimer and offering a highly hydrophilic microenvironment to the enzyme. On the other hand, PAMAM dendrimer was

employed as amino-enriched soft support for multipoint covalent immobilization of Tyr. Biofunctionalization of the sensing interface was then accomplished by layering Tyr protein molecules on the PAMAM-coated surface. Glutaraldehyde was finally added to provide stability to the biosensing ensemble and to ensure retention of the enzyme molecules on the electrode surface, allowing the formation of covalent cross-links between the primary amino groups of the dendrimer and the enzyme molecules.

The influence of the electrode composition on the amperometric response measured at -200 mV for catechol was tested (**Figure 2**). As expected, very low currents were measured when Tyr was loaded on a bare GCE. This amperometric response was 4-fold increased when using rGO-CMC as electrode coating material indicating that the polymer-rGO nanohybrid offer a more favorable microenvironment for enzyme immobilization. However, the measured current increased dramatically when a GO-CMC/PAMAM layer-by-layer assembly was employed as scaffold for Tyr immobilization, suggesting the high density of primary amino groups at the dendrimer allowed a high loading of the enzyme molecules on the modified interface.

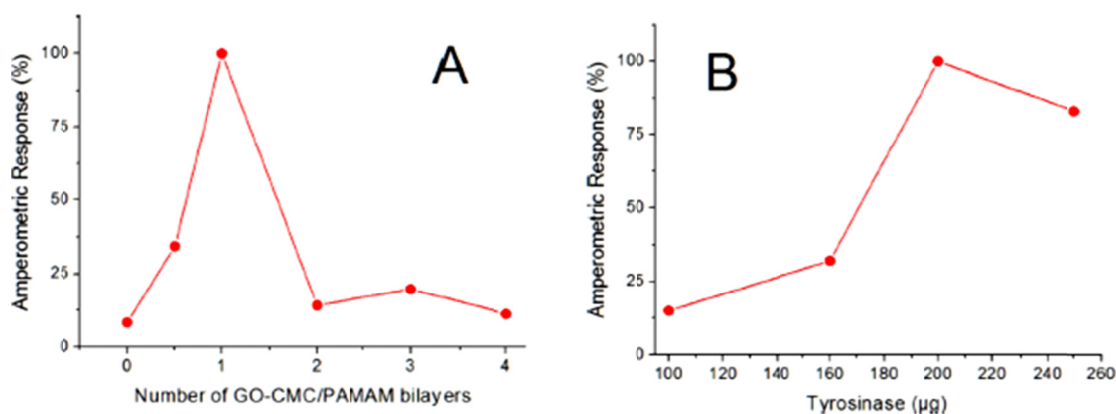


Figure 2. Effect of the GO-CMC/PAMAM bilayer composition (**A**) and immobilized tyrosinase (**B**) on the amperometric response of the Tyr/PAMAM/CMC-GO/GCE toward catechol. $E_{app} = -200$ mV.

The amperometric response of the bioelectrode decreases drastically when additional GO-CMC/PAMAM bilayers were assembled on the electrode surface, which can be ascribed to a low structural stability of these multilayer architectures. Regarding Tyr loading, the largest amperometric response was achieved when 200 μ g Tyr were covalently immobilized on the electrode surface (**Figure 2B**).

The sequential assembly of the optimized layer-by-layer architecture on GCE surface was qualitatively studied by cyclic voltammetry. **Figure 3** displays the cyclic

voltammograms recorded from 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ in 0.1 M KCl solution with electrodes prepared after each assembly step. As can be easily observed, the pattern of the voltammograms significantly changed after each layering step, suggesting successful assembly of the biosensing interface.

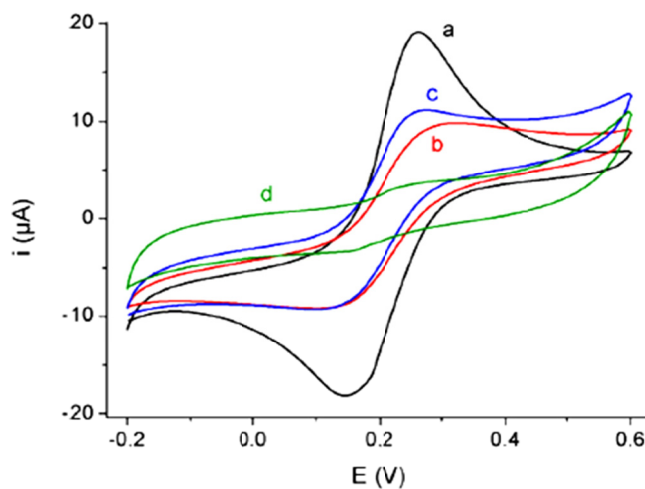


Figure 3. Cyclic voltammograms obtained at a GCE before (a) and after sequential layering with rGO-CMC (b) and PAMAM (c), and further immobilization of Tyr (d), in 0.1 M KCl solution containing 5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] / \text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1).

The morphological changes occurring on the nanostructured material after the layer-by-layer assembly of the biosensing architecture were followed by FE-SEM, and typical images are shown in **Figure 4**. The characteristic flat topology of the exfoliated GO sheets changed to partially wrinkled structures after covalent attachment of CMC, as it has been described previously [9].

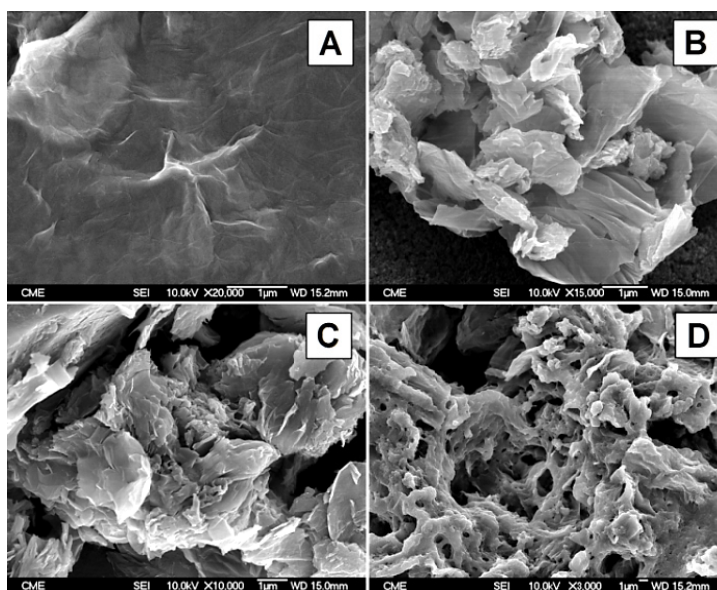


Figure 4. FE-SEM images of GO (A), rGO-CMC (B), PAMAM/rGO-CMC (C) and Tyr/PAMAM/rGO-CMC (D).

Layering PAMAM molecules on this hybrid nanomaterial resulted in a smoother surface, which can be ascribed to the organic nature of the polyamidoamine dendrimer. A more homogeneous and significantly smoother morphology was observed after immobilization of Tyr, suggesting high coverage of the nanomaterial with the enzyme protein molecules.

Figure 5 shows the cyclic voltammograms recorded at the enzyme electrode before and after addition of catechol to the solution. As can be observed, the cathodic current, corresponding to the reduction of the 1,2-benzoquinone generated in the Tyr-catalyzed oxidation of catechol, increased with the aromatic phenol concentration, thus suggesting that the constructed biosensor can be evaluated for the electroanalytical determination of this analyte.

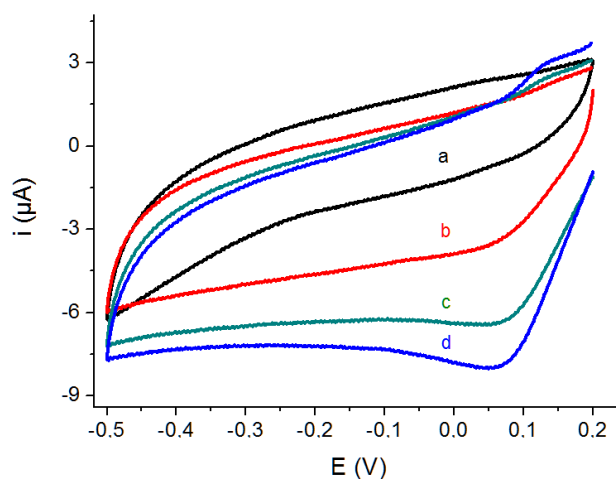
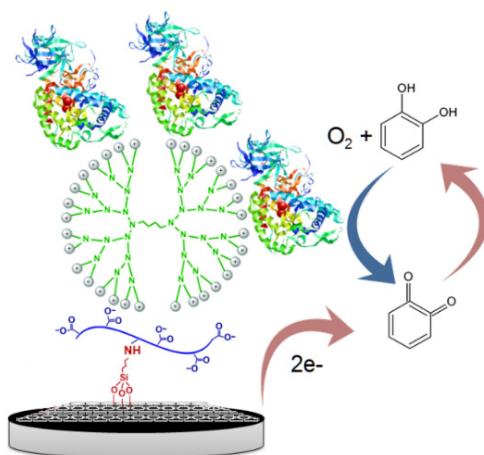


Figure 5. Cyclic voltammograms recorded at the Tyr/PAMAM/ GO-CMC/GCE in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.5 at scan rate of 50 mV/s before (a) and after addition of 450 nM (b), 900 nM (c) and 1.4 μ M (d) catechol.

The mechanism for the enzyme-catalyzed electrochemical detection of catechol on the electrode surface is illustrated in **Scheme 1**.



Scheme 1. Mechanism for Tyr-catalyzed electrochemical detection of catechol.

The working potential for the Tyr/PAMAM/GO-CMC/ GCE were established by measuring the amperometric response of the electrode toward catechol at pH 6.5 (Figure 6A). The biosensor exhibited a bell-shaped behavior for the measured currents vs the applied potential with maximum value at $E = -200$ mV. Similar pattern was observed for the amperometric response of the electrode, fixed at -200 mV, but measured in solution of different values of pH (Figure 6B). Higher analytical response was achieved at pH 6.5. Accordingly, further experiments were performed under these working conditions

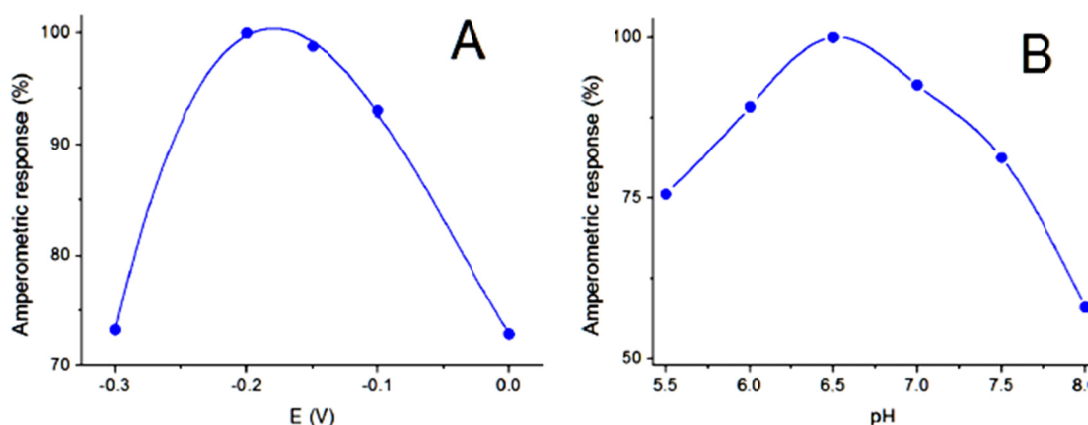


Figure 6. Effect of the applied potential (A) and working pH (B) on the amperometric response of the Tyr/PAMAM/GO-CMC/GCE toward catechol.

Figure 7A shows the typical dynamic amperometric response of the developed biosensor upon successive additions of $2.0 \mu\text{M}$ catechol solution. The biosensor showed fast catalytic response, reaching 95 % of the steady-state current in about 4 s. Figure 7B displays the calibration graph constructed from the data of ten different experiments. The biosensor exhibited a linear range ($r^2 = 0.998 \pm 001$) between $2.0 - 400$ nM catechol according to the following equation:

$$i \text{ (A)} = (6.3 \pm 0.1) \times c \text{ (catechol (M))} + (1.9 \times 10^{-8} \pm 8.6 \times 10^{-9})$$

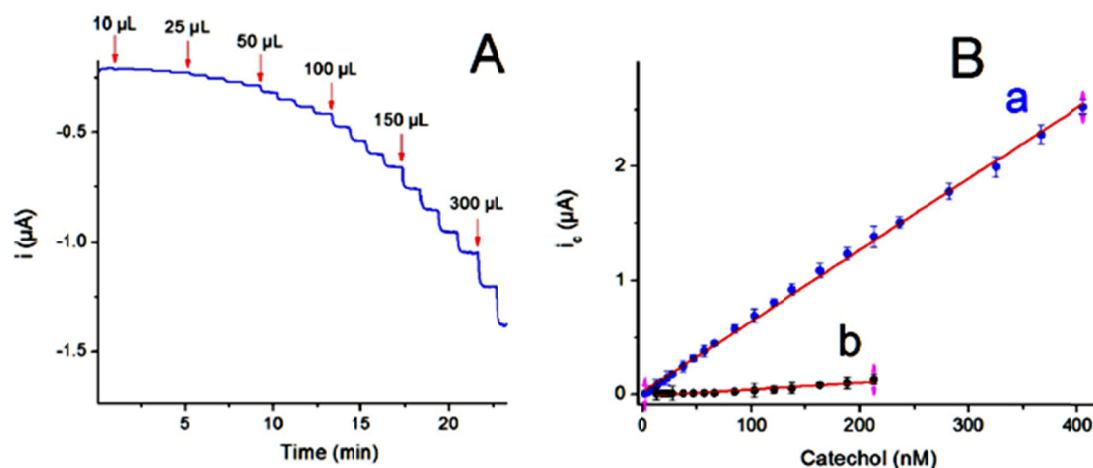


Figure 7. Dynamic amperometric responses (A) and calibration curve (B) obtained with the Tyr/PAMAM/GO-CMC/GCE (a) and the PAMAM/GO-CMC/GCE (b) for different catechol concentrations. $E_{\text{app}} = -200$ mV, catechol stock solution = 2.0 μM . Each point represents the mean \pm SD for 10 different electrodes.

The enzyme biosensor showed a very high sensitivity of 6.3 A/M and a very low detection limit of 0.9 nM, which was calculated according to the $3S_b/m$ criterion where m is the slope of the calibration graph and S_b was estimated as the standard deviation of 10 different amperometric signals recorded for the lowest catechol concentration in the calibration graph (2 nM). On the contrary, no significant analytical response was observed for the PAMAM/GO-CMC/GCE, confirming the relevance of Tyr in the electrocatalytic detection of catechol.

Table 1. Comparison of the analytical performance of the Tyr/PAMAM/GO-CMC/GCE with that of previously reported Tyr-based biosensors for catechol.

Electrode	Linear range (μM)	Sensitivity (mA/M)	LOD (nM)	K _m (μM)
Tyr/Sol-gel-AuNPs/ITO [13]	1–6	10	300	2.2
Tyr/MCN/GCE [14]	0.05–12.5	650.1	12.24	11.07
Tyr/IL-MWNT-DHP/GCE [15]	4.9–1100	32.8	580	190
Tyr/MWNT-PPy/GCE [16]	3–50	8	670	–
Tyr-Ada/MNP-CD/CPE [17]	0.1–12	12	22	74
Tyr/PAMAM-rGO/GCE [8b]	0.01–22	424	6	37.1
Tyr/rGO-CMC/GCE [9]	0.02–56	270	0.2	–
Tyr/PO ₄ -PPy/Pt [18]	10–120	47	840	80.2
Tyr/MWNT-MNP/SPE [19]	10–80	4.8	7600	180
Tyr/AuNC/PSS/SPE [20]	0.01–80	13.72	0.4	–
Tyr/PANI/SWNT/GCE [21]	0.25–92	244	80	24.71
Tyr/pAu-PAMAM/Au [12]	0.05–10	19	20	21.9
Tyr/PAMAM/GO-CMC/GCE [This work]	0.002–0.4	630	0.9	7.2

LOD: limit of detection; **Sol:** silicate-based sol-gel; **AuNPs:** Au nanoparticles; **ITO:** indium tin oxide electrode; **MCN:** mesoporous carbon nitride; **IL:** ionic liquid; **MWNT:** multi-walled Carbon nanotubes; **DHP:** dihexadecylphosphatetrimethylammonium bromide; **PPy:** polypyrrole; **MNP:** magnetic nanoparticles; **Ada:** adamantane; **CD:** cyclodextrin; **CPE:** carbon paste electrode; **PO₄-PPy:** phosphate-doped polypyrrole; **SPE:** screen printed carbon electrode; **AuNC:** Au nanocubes; **PSS:** poly(sodium 4-styrenesulfonate); **PANI:** polyaniline; **SWNT:** single-walled carbon nanotubes; **pAu-PAMAM:** electropolymerized AuNPs coated with PAMAM dendrons.

A comparison of the analytical performance of the Tyr/PAMAM/GO-CMC/GCE with that reported in the literature for other Tyr-based biosensors for catechol is summarized in **Table 1**. As it can be deduced, the nanostructured biosensor with layer-by-layer architecture showed excellent analytical characteristics in terms of linear range of amperometric response, sensitivity and limit of detection. The apparent kinetics constants for the electrocatalytic transformation of catechol to 1,2-benzohydroquinone at the enzyme electrode surface were calculated according to the Eadie-Hofstee method. The calculated values for K_M^{app} and I_{MAX}^{app} were 1.2 μM and 7.2 μA , respectively. The value of the apparent Michaelis-Menten constant was 200-fold lower than that reported for the free enzyme (240 μM) [22], indicating the PAMAM/GO-CMC layer-by-layer assembly acted as an excellent scaffold for Tyr immobilization, providing a favorable microenvironment for the catalytic action of the enzyme. This value was also significantly lower than other previously reported for Tyr immobilized on electrode

surfaces, suggesting this nanostructured assembly could be evaluated for the design of other enzyme biosensors.

The Tyr/PAMAM/GO-CMC/GCE showed also an excellent reproducibility and stability. In this regard, ten successive amperometric measurements for 100 nM catechol yielded a relative standard deviation (RSD) value of 5.6 %. In addition, the electrode-to-electrode reproducibility, which was evaluated by measuring the responses of ten different electrodes similarly prepared toward 100 nM catechol, provided a RSD value of 8.6 %.

Interference studies were performed by measuring the amperometric response towards 100 nM catechol in the presence of six potential interfering substances at a 100 nM concentration level: ascorbic acid, tyrosine, uric acid, epinephrine, estriol and 17 β -estradiol. The biosensor showed high selectivity toward catechol, and its amperometric response was only affected (~25 %) by the presence of 17 β -estradiol.

The stability of the biosensor upon storage at 4 °C in dry conditions was assessed by periodic evaluation of its amperometric response toward 100 nM catechol. As can be observed in **Figure 8**, the enzyme electrode exhibited good long-term stability retaining over 93 % of its initial activity after 40 days of storage. This remarkably long storage stability could be ascribed to an increased conformational stabilization for the enzyme molecules due to dendrimers. In addition, multipoint electrostatic interactions with the positive charged dendrimer could also contribute to the structural stabilization of the enzyme molecules [23].

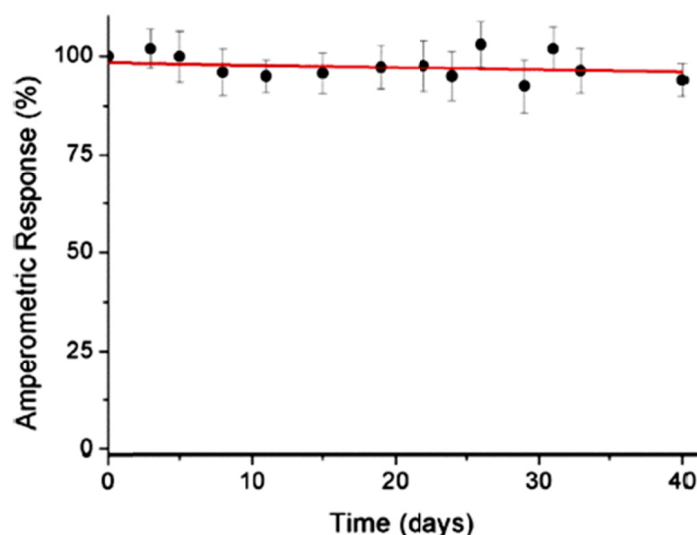


Figure 8. Effect of the storage time at 4 °C on the relative amperometric response of the Tyr/PAMAM/GO-CMC/GCE toward 100 nM catechol. Each point represents the mean \pm SD for three different electrodes.

To validate this enzyme biosensor, the electroanalytical signals were compared with those obtained by conventional Folin-Ciocalteu colorimetric method for phenols, using catechol as standard (**Figure 9**). A linear relationship ($r = 0.993 \pm 0.005$) was observed for the analytical signals obtained by from both methods in the range of 0–7.62 nM catechol, according to the following equation:

$$i \text{ (nA)} = 3.34 \times A_{750\text{nm}} - 1.59$$

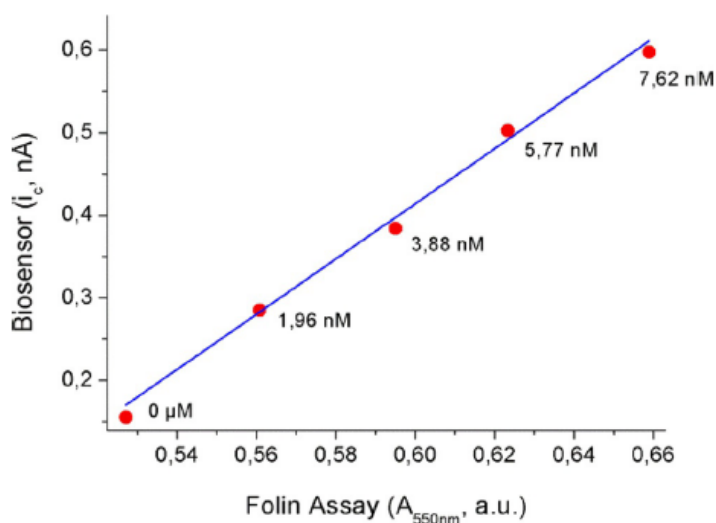


Figure 9. Relationship between the analytical signal of the biosensor and the absorbance at 750 nm of catechol samples analyzed by the Folin-Ciocalteu colorimetric method.

On this basis, the biosensor was finally employed to determine total phenol content in commercial peppermint herbal tea samples (Lipton), using catechol as standard. The concentration of total phenols was estimated as 26.1 ± 0.6 mg/g, in agreement with previous reports [24].

CONCLUSIONS

A novel biosensing interface was prepared by coating GCE with rGO-CMC hybrid nanomaterial and further layering with PAMAM dendrimer. This layer-by-layer architecture demonstrated to be a suitable scaffold for the covalent immobilization of the enzyme tyrosinase, according to the excellent analytical performance, kinetics constants and storage stability properties exhibited by the enzyme electrode. These results suggest that this novel 3D nanostructured arrangement could be useful for the design of other enzymatic and non-enzymatic electrochemical biosensors with advanced characteristics.

ACKNOWLEDGEMENTS

R. Villalonga acknowledge to Ramón & Cajal Contract from the Spanish Ministry of Science and Innovation. Financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación CTQ2011-24355, CTQ2012-34238 and Comunidad de Madrid S2013/MIT-3029, Programme NANOAVANSENS is gratefully acknowledged.

REFERENCES:

- [1] a) J. Wang, *Analyst* 2005, 130, 421–426.
b) S. Marin, A. Merkoçi, *Electroanalysis* 2012, 24, 459–469.
c) A. Walcarius, S. D. Minteer, J. Wang, Y. Lin, A. Merkoçi, *J. Mater. Chem. B* 2013, 1, 4878–4908.
- [2] a) A. M. Ng, C. T. Lim, H. Y. Low, K. P. Loh, *Biosens. Bioelectron.* 2005, 65, 265–273.
b) K. Nakamoto, R. Kurita, O. Niwa, *Anal. Chem.* 2012, 84, 3187–3191.
- [3] a) A. Chen, S. Chatterjee, *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 5425–5438.
b) R. Villalonga, P. Diez, P. Yanez-Sedeño, J. M. Pingarron, *Electrochim. Acta* 2011, 56, 4672–4677.
c) M. Eguilaz, R. Villalonga, P. Yañez-Sedeño, J. M. Pingarron, *Anal. Chem.* 2011, 83, 7807–7814.
- [4] a) E. Roduner, *Chem. Soc. Rev.* 2006, 35, 583–592.
b) V. Biju, *Chem. Soc. Rev.* 2014, 43, 744–764.
- [5] a) D. Grosso, F. Ribot, C. Boissiere, C. Sanchez, *Chem. Soc. Rev.* 2011, 40, 829–848.
b) R. Villalonga, C. Camacho, R. Cao, J. Hernandez, J. C. Matias, *Chem. Commun.* 2007, 942–944.
c) R. Villalonga, M. L. Villalonga, P. Diez, J. M. Pingarron, *J. Mater. Chem.* 2011, 21, 12858–12864.
- [6] a) B. G. Choi, H. S. Park, T. J. Park, M. H. Yang, J. S. Kim, S. Y. Jang, N. S. Heo, S. Y. Lee, J. Kong, W. H. Hong, *ACS Nano* 2010, 4, 2910–2918.
b) F. Xiao, Y. Li, X. Zan, K. Liao, R. Xu, H. Duan, *Adv. Funct. Mater.* 2012, 22, 2487 – 2494.
c) E. Araque, C.B. Arenas, M. Gamella, J. Reviejo, R. Villalonga, J. M. Pingarron, *J. Electroanal. Chem.* 2014, 717–718, 96–102.
d) Y. Shao, J. Wang, H. Wu, J. Liu, I. A. Aksay, Y. Lin, *Electroanal.* 2010, 22, 1027–1036.
- [7] a) J. Zhao, G. Chen, L. Zhu, G. Li, *Electrochem. Commun.* 2011, 13, 31–33.

- b) Y. Ma, M. Zhao, B. Cai, W. Wang, Z. Ye, J. Huang, *Chem. Commun.* 2014, 50, 11135–11138.
- c) Y. Yu, Z. Chen, S. He, B. Zhang, X. Li, M. Yao, *Biosens. Bioelectron.* 2014, 52, 147–152.
- [8] a) Q. Xu, S. X. Gu, L. Jin, Y. E. Zhou, Z. Yang, W. Wang, X. Hu, *Sensor Actuators B: Chem.* 2014, 190, 562–569.
- b) E. Araque, R. Villalonga, M. Gamella, P. Martinez-Ruiz, J. Reviejo, J. M. Pingarron, *J. Mater. Chem. B* 2013, 1, 2289–2296.
- c) H. Bao, Y. Pan, Y. Ping, N. G. Sahoo, T. Wu, L. Li, J. Li, L. H. Gan, *Small* 2011, 7, 1569–1578.
- d) Z. Liu, J. T. Robinson, X. Sun, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 10876–10877.
- e) L. Zhang, Z. Lu, Q. Zhao, J. Huang, H. Shen, Z. Zhang, *Small* 2011, 7, 460–464.
- [9] E. Araque, R. Villalonga, M. Gamella, P. Martínez-Ruiz, A. Sánchez, V. García-Baonza, J. M. Pingarron, *ChemPlusChem* 2014, 79, 1334–1341.
- [10] a) H. L. Ramirez, A. Valdivia, R. Cao, J. J. Torres-Labandeira, A. Fragoso, R. Villalonga, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 16, 1499–1501.
- b) H. L. Ramirez, R. Cao, A. Fragoso, J. J. Torres-Labandeira, A. Dominguez, E. H. Schacht, M. Baños, R. Villalonga, *Macromol. Biosci.* 2006, 6, 555–561.
- [11] a) H. V. Sither, H. K. Holme, G. Maurstad, O. Smidsrod, B. T. Stokke, *Carbohydr. Polym.* 2008, 74, 813–821.
- b) L. Gymez, H. L. Ramirez, M. L. Villalonga, J. Hernandez, R. Villalonga, *Enzyme Microb. Technol.* 2006, 38, 22–27.
- c) L. Gymez, H. L. Ramirez, A. Neira-Carrillo, R. Villalonga, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2006, 28, 387–395.
- [12] R. Villalonga, P. Diez, S. Casado, M. Eguilaz, P. Yañez-Sedeño, J. M. Pingarron, *Analyst* 2012, 137, 342–348.
- [13] S. Singh, D. V. S. Jain, M. L. Singla, *Sensor Actuators B, Chem.* 2013, 182, 161–169.
- [14] Y. Zhou, L. Tang, G. Zeng, J. Chen, Y. Cai, Y. Zhang, G. Yang, Y. Liu, W. Tang, *Biosens. Bioelectron.* 2014, 61, 519–525.
- [15] F. C. Vicentini, B. C. Janegitz, C. M. Brett, O. Fatibello-Filho, *Sensor Actuators B, Chem.* 2013, 188, 1101–1108.
- [16] S. K. Ozoner, M. Yalvac, E. Erhan, *Curr. Appl. Phys.* 2010, 10, 323–328.
- [17] P. Diez, R. Villalonga, M. L. Villalonga, J. M. Pingarron, *J. Colloid Interf. Sci.* 2012, 386, 181–188.
- [18] C. Apetrei, M. L. Rodriguez-Mondez, J. A. De Saja, *Electrochim. Acta* 2011, 56, 8919–8925.

- [19] B. Perez-Lopez, A. Merkoçi, *Adv. Funct. Mater.* 2011, 21, 255–260.
- [20] M. N. Karim, J. E. Lee, H. J. Lee, *Biosens. Bioelectron.* 2014, 61, 147–151.
- [21] B. Wang, J. Zheng, Y. He, Q. Sheng, *Sensor Actuators B: Chem.* 2013, 186, 417–422.
- [22] J. L. Smith, R. C. Krueger, *J. Biol. Chem.* 1962, 237, 1121–1128.
- [23] a) M. L. Villalonga, M. Fernandez, A. Fragoso, R. Cao, R. Villalonga, *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2003, 33, 53–66;
b) M. L. Villalonga, P. Diez, A. Sanchez, M. Gamella, J. M. Pingarron, R. Villalonga, *Chem. Rev.* 2014, 114, 4868–4917.
- [24] L. G. Riachi, C. A. B. De Maria, *Food Chem.* 2015, 176, 72–81.

7.2

Sensors and Actuators B: Chemical
232, 2016, 84-90

**Reduced graphene oxide-carboxymethyl cellulose layered
with platinum nanoparticles/PAMAM dendrimer/
magnetic nanoparticles hybrids. Application to the
preparation of enzyme electrochemical biosensors**

REDUCED GRAPHENE OXIDE-CARBOXYMETHYLCELLULOSE LAYERED WITH PLATINUM NANOPARTICLES/PAMAM DENDRIMER/MAGNETIC NANOPARTICLES HYBRIDS. APPLICATION TO THE PREPARATION OF ENZYME ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS

Boryana Borisova,^a Alfredo Sánchez,^a Sandra Jiménez-Falcao,^a Miriam Martín,^b Pedro Salazar,^{b,c} Concepción Parrado,^a José M. Pingarrón,^{a,d*} Reynaldo Villalonga,^{a,d}

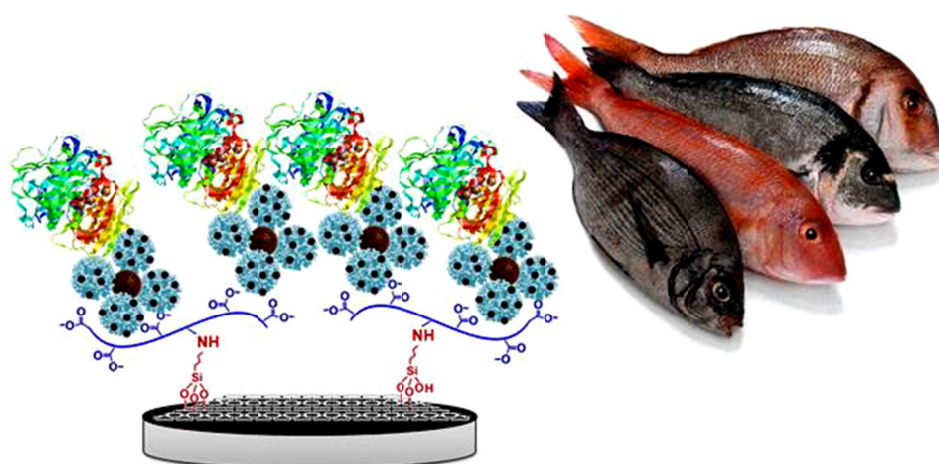
^aDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040-Madrid Spain.

^bNeurochemistry and Neuroimaging Group, Laboratory of Sensors, Biosensors and Materials, Faculty of Medical Sciences, University of La Laguna, Campus de Ofra s/n, 38071 La Laguna, Tenerife (Spain).

^cLaboratory of Nanotechnology on Surfaces, Institute of Materials Science of Seville (CSIC-Univ. Seville), Calle Américo Vespucio 49, Seville, Spain.

IMDEA Nanoscience, Ciudad Universitaria de Cantoblanco, 28049-Madrid, Spain.

* e-mail: pingarro@quim.ucm.es, rvillalonga@quim.ucm.es



7.3

Analytical and Bioanalytical Chemistry
409, 2017, 5667-5674

**Disposable electrochemical immunosensor for
Brettanomyces Bruxellensis based on nanogold-reduced
graphene oxide hybrid nanomaterial**

DISPOSABLE ELECTROCHEMICAL IMMUNOSENSOR FOR *BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS* BASED ON NANOGOLD-REDUCED GRAPHENE OXIDE HYBRID NANOMATERIAL

Boryana Borisova¹, María L. Villalonga², María Arévalo-Villena³, Abderrahmane Boujakhrou¹, Alfredo Sánchez¹, Concepción Parrado¹, José M. Pingarrón³, Ana Briones-Pérez⁴, Reynaldo Villalonga¹

¹Nanosensors and Nanomachines Group, Department of Analytical

Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

²Center for Enzyme Technology, University of Matanzas, 44740 Matanzas, Cuba

³Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

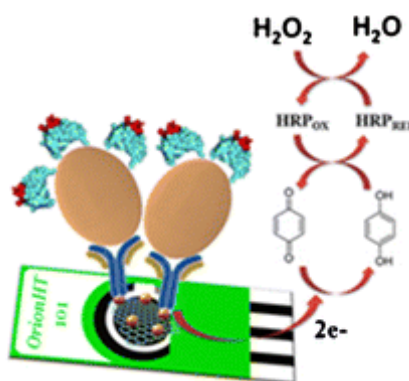
⁴Regional Institute of Applied Scientific Research (RIASR), Av. Camilo Jose Cela S/N, Universidad de Castilla-La Mancha, Campus Universitario, 13071 Ciudad Real, Spain

Email: Ana Briones-Pérez: ana.briones@uclm.es

Email: Reynaldo Villalonga: rvillalonga@quim.ucm.es



Brettanomyces bruxellensis



7.4

Analytical and Bioanalytical Chemistry
410, 2018, 7901–7907

**Disposable amperometric immunosensor for
Saccharomyces cerevisiae based on carboxylated
graphene oxide-modified electrodes**

DISPOSABLE AMPEROMETRIC IMMUNOSENSOR FOR SACCHAROMYCES CEREVISIAE BASED ON CARBOXYLATED GRAPHENE OXIDE-MODIFIED ELECTRODES

Boryana Borisova,^a Alfredo Sánchez,^{a,*} Paul E. D. Soto Rodriguez,^a Abderrahmane Boujakhrou,^b María Arévalo-Villena,^c José M. Pingarrón,^d Ana Briones-Pérez,^c Concepción Parrado,^a Reynaldo Villalonga^{a,*}

^aNanosensors and Nanomachines Group, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

^bOrion High Technologies S.L., Calle Turín 15, N 3, 28983 Parla, Madrid, Spain

^cRegional Institute of Applied Scientific Research (RIASR), Av Camilo Jose Cela S/N, Universidad de Castilla-La Mancha, Campus Universitario, 13071 Ciudad Real, Spain

^dDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

Corresponding authors: alfredos@ucm.es, rvillalonga@quim.ucm.es

7.5

Sensors and Actuators B: Chemical
279, 2019, 15-21

Disposable electrochemical biosensors for *Brettanomyces bruxellensis* and total yeast content in wine based on core-shell magnetic nanoparticles

DISPOSABLE ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS FOR *BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS* AND TOTAL YEAST CONTENT IN WINE BASED ON CORE-SHELL MAGNETIC NANOPARTICLES

María L. Villalonga,^a Boryana Borisova,^b Christian B. Arenas,^b Anabel Villalonga,^b María Arévalo-Villena,^c Alfredo Sánchez,^b José M. Pingarrón,^d Ana Briones-Pérez,^{c,*} Reynaldo Villalonga^{b,*}

^aCenter for Enzyme Technology, University of Matanzas, Matanzas 44740, Cuba

^bNanosensors and Nanomachines Group, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

^cRegional Institute of Applied Scientific Research (RIASR), Av Camilo Jose Cela S/N, Universidad de Castilla-La Mancha, Campus Universitario, 13071 Ciudad Real, Spain

^dDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

*Corresponding authors: ana.briones@uclm.es, villalonga@quim.ucm.es



8.

Discusión Integradora

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han diseñado seis biosensores electroquímicos amperométricos para el análisis de alimentos. El diseño de estos biosensores se ha basado en nanomateriales, ya que, como se ha podido comprobar, el uso de estos nanomateriales en la construcción de bioplataformas sensoras electroquímicas aporta importantes ventajas que resultan en mejores características analíticas.

Como transductor y soporte para el ensamblaje de estos biosensores electroquímicos se han empleado electrodos de carbono, debido a que en cuatro de los cinco trabajos se han empleados derivados de grafeno, lo que facilita la modificación de la superficie del electrodo mediante interacciones π - π entre la superficie de carbono y estos derivados. En este sentido, se han desarrollado dos biosensores enzimáticos, los cuales se han construido sobre electrodos de carbono vitrificado (glassy carbon electrodes, GCE), debido a que con estos biosensores se pueden realizar numerosas medidas, es decir, se pueden reutilizar, ya que tras la transformación enzimática del analito, la enzima vuelve a su estado original.

Por el contrario, en el caso de los tres últimos trabajos, en los cuales se han diseñado distintos inmunosensores, debido a que la interacción de afinidad entre el analito y los anticuerpos usados como elementos de biorreconocimiento es muy fuerte y difícil de romper, estos sensores son de un solo uso, por lo que se han ensamblado sobre electrodos serigrafiados de carbono (screen-printed carbon electrodes, SPCE), ya que son soportes mucho más económicos y desechables.

En el caso del último trabajo realizado durante esta tesis, que consisten en dos inmunosensores donde se emplean nanopartículas magnéticas modificadas con biorreceptores de afinidad como elementos de captura de los analitos, el soporte transductor empleado ha sido nuevamente los electrodos serigrafiados de carbono, ya que por sus dimensiones físicas facilitan la incorporación de un pequeño imán bajo la superficie del electrodo de trabajo de forma que las nanopartículas magnéticas se retengan sobre la superficie de este electrodo para llevar a cabo la medida.

Durante el desarrollo de estos seis biosensores electroquímicos se ha seguido una metodología similar, que ha consistido en la optimización de la construcción de las plataformas biosensoras, donde se incluyen cantidades de nanomateriales o de biorreceptores entre otros parámetros, seguido de la optimización de las condiciones de medida, tales como pH del medio o potencial de trabajo aplicado. Posteriormente, con todos los parámetros que afectan al ensamblaje y la medida optimizados, se han obtenido los parámetros analíticos de cada uno de los

biosensores, como intervalo lineal, límite de detección o cuantificación, reproducibilidad, selectividad, estabilidad, y finalmente se ha evaluado la aplicabilidad de estos biosensores a muestras reales, validando los resultados por comparación con otras técnicas bien establecidas para cada uno de los casos.

Con el fin de mostrar de una forma más clara la relación existente entre los distintos trabajos recogidos en la presente tesis, se van a describir los resultados obtenidos con estos biosensores, agrupándolos en dos bloques, por un lado los biosensores catalíticos (enzimáticos), contruidos con una arquitectura capa-a-cap, y por otro los biosensores de afinidad (inmunosensores).

8.1 Biosensores enzimáticos contruidos por capas basadas en nanomateriales híbridos

En esta sección se describen los dos biosensores enzimáticos diseñados con arquitectura capa-a-capa. Para el ensamblaje de estos biosensores, la estrategia seguida se basa en incluir capa tras capa, de diferente naturaleza, con el fin de poder aumentar la cantidad de enzima sobre la superficie del biosensor, ya que esta enzima actuará como biorreceptor del analito de interés. En ambos casos, se ha empleado un derivado de óxido de grafeno reducido modificado con carboximetilcelulosa como primera capa, ya que se une al carbono del electrodo mediante las interacciones π - π . Este derivado presenta una mayor solubilidad y aporta grupos funcionales de los cuales el grafeno carece, de forma que se solventan algunas de las limitaciones del empleo de grafeno, manteniendo parte de sus ventajas, como alta conductividad.

El derivado de grafeno empleado en esta primera capa presenta carga negativa, de forma que permite su uso para el posterior ensamblaje de una segunda capa con carga positiva a través de interacciones electrostáticas. En este sentido, la segunda capa empleada en el diseño de estos biosensores tiene como base el dendrímero de poliamidoamina (PAMAM), que presenta una alta densidad de grupos amino, con carga positiva, que permite la formación de puentes salinos multipuntuales con el derivado de grafeno empleado. La elección de una capa de dendrímero en una estructura por capas se basa en su elevada área superficial y las cavidades que presenta su estructura, que permite una elevada carga de enzima activa sobre la superficie del electrodo así como una buena difusión de las especies hacia la superficie sensora.

Estas novedosas estructuras tridimensionales se emplearon como soporte para la inmovilización covalente de las enzimas empleando glutaraldehído como agente de entrecruzamiento.

El derivado de óxido de grafeno reducido modificado con carboximetilcelulosa (rGO-CMC) se preparó mediante anclaje covalente del polisacárido soluble [Araque et al., 2014a]. Esta metodología consiste en dos etapas, como se muestra en la **Figura 8.1**. Inicialmente, el óxido de grafeno (GO) se funcionaliza con 3-aminopropil-trietoxisilano (APTES) a través de los grupos hidroxilos de las láminas de grafeno, obteniéndose así el derivado GO-APTES. A continuación, CMC previamente oxidada con metaperiodato de sodio (m -NaIO₄), se une a los grupos amino presentes en la superficie del grafeno mediante alquilación reductiva con NaBH₄. En este proceso se produce además la reducción de los grupos epoxi y carbonilos de las láminas de

grafeno. De este modo se obtiene el derivado rGO-CMC, cuya dispersión en agua se mantuvo estable durante varios meses a temperatura ambiente.

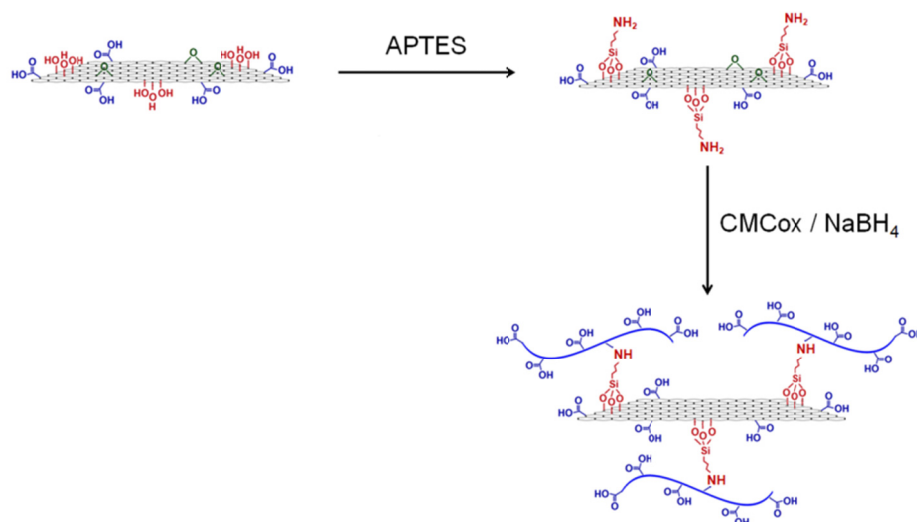


Figura 8.1. Proceso de preparación del derivado híbrido rGO-CMC

El nanomaterial híbrido obtenido se caracterizó por diferentes técnicas físico-químicas, tales como FT-IR, espectroscopía Raman, microscopía electrónica de barrido con emisión de campo, y de transmisión de alta resolución, microscopía de fuerza atómica, etc. Este material se empleó posteriormente para modificar electrodos de carbono vitrificado, para a partir de ellos desarrollar los biosensores deseados.

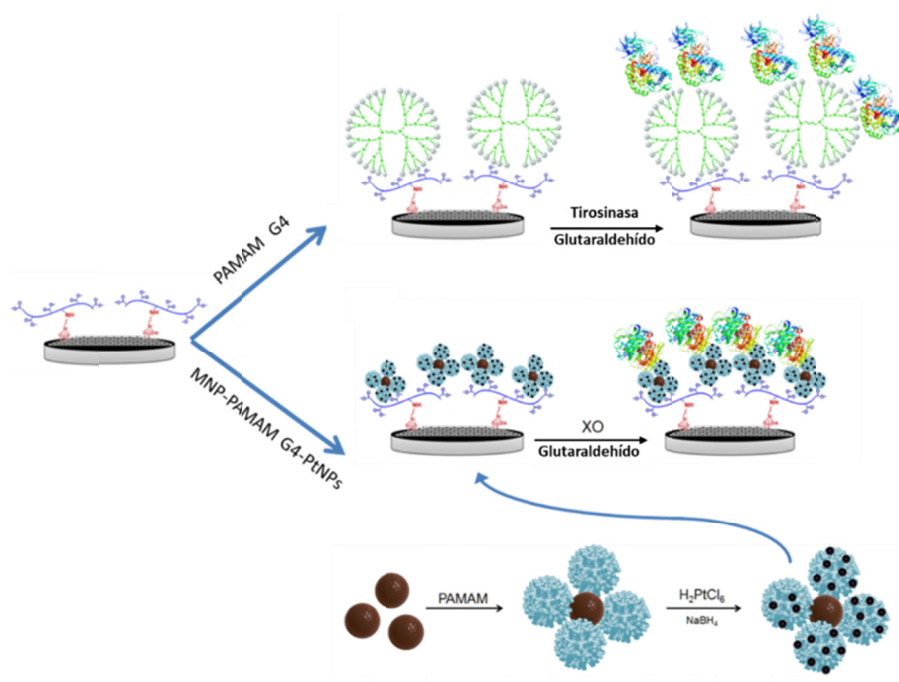


Figure 8.2. Ensamblaje mediante estructura capa de los biosensores basados en rGO-CMC.

En cuanto a la capa basada en dendrímeros, es donde aparecen las principales diferencias entre ambos biosensores, ya que en uno de los trabajos se emplea directamente PAMAM G4, para posteriormente inmovilizar sobre esta estructura la enzima tirosinasa para la detección de catecol (Tyr/PAMAM/rGO-CMC/GCE). En el segundo de los trabajos, lo que se emplea para formar esta capa son partículas magnéticas cubiertas de polidopamina, funcionalizadas con PAMAM G4 que se encuentra decorado con nanopartículas de platino. Sobre esta capa se inmoviliza la enzima xantina oxidasa, para determinar xantina en muestras de pescado como parámetro de frescura (XO/MNP-PAMAM-PtNP/rGO-CMC/GCE). El ensamblaje de ambos biosensores se muestra en la **Figura 8.2**.

La razón de incorporar tanto nanopartículas magnéticas como metálicas en el diseño del segundo biosensor se debe a las características de la detección del analito seleccionado en ese caso, la xantina, ya que esta detección electroquímica se suele dar a potenciales elevados, lo que suele ser negativo de cara a la estabilidad del biosensor, la selectividad y el efecto de interferentes entre otros parámetros [Dervisevic et al., 2017a; Cevik, 2016; Dalkiran et al., 2017; Bas et al., 2011]. Por esta razón, la incorporación de estas nanopartículas, que presentan una buena actividad electrocatalítica, se espera que permita disminuir el potencial de trabajo para la determinación de xantina [Wang et al., 2010; Hrapovich et al., 2004; Raj & John, 2013; Geniès et al., 1998; Guo et al., 2010; Hasanzadeh et al., 2015; Teymourian & Khezrian, 2013; Saadaoui et al., 2016].

Esta actividad electrocatalítica se evaluó para las nanopartículas de platino, para lo que se realizaron ensayos similares mediante voltamperometría cíclica en presencia y en ausencia de estas nanopartículas, observándose que la señal de la xantina a una concentración de 80 μM es significativa para potenciales superiores a 200 mV, mientras que en ausencia de estas nanopartículas solo es posible detectar la xantina a potenciales superiores a 700 mV (**Figura 8.3**). Este hecho demuestra la actividad electrocatalítica de estas nanopartículas, así como la importancia de incluirlas en el diseño del biosensor.

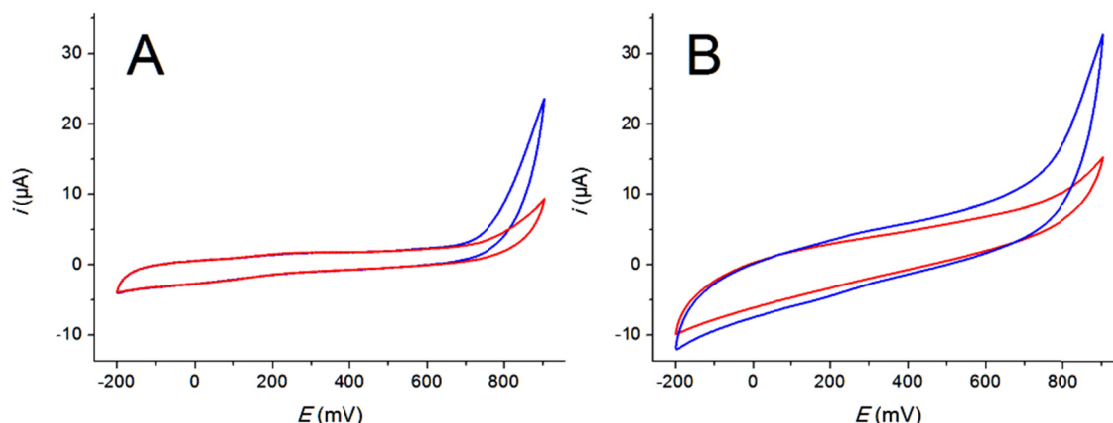


Figura 8.3 Voltamperogramas cíclicos de los biosensores preparados sin (A) y con nanopartículas de platino (B) en presencia (curvas azules) y ausencia (curvas rojas) de xantina 80 μ M en 0.1 M PBS, pH 8.0 con una velocidad de barrido de 50 mV/s.

El primero de los dos biosensores enzimáticos con arquitectura de capa-a-capas, usando PAMAM G4 sin modificar, se publicó en *Electroanalysis* [Borisova et al., 2015]. El ensamblaje secuencial del biosensor sobre la superficie de un electrodo de carbono vitrificado se confirmó mediante voltamperometría cíclica, usando $K_3[Fe(CN)_6]$ / $K_4[Fe(CN)_6]$ como especie electroactiva. Como se puede observar en la **Figura 8.4**, los voltamperogramas obtenidos en cada una de las etapas varían notablemente, lo que nos indica el éxito de cada una de las modificaciones. Como se puede comprobar, la incorporación del derivado rGO-CMC sobre la superficie del electrodo provoca una disminución drástica en la respuesta de este a la especie electroactiva utilizada, lo que sería contrario a mejorar la conductividad gracias al grafeno. Esta disminución se debe a la alta densidad de carga negativa que presenta el nanomaterial híbrido como consecuencia de los grupos oxigenados presentes en la CMC, ya que aparecen fenómenos de repulsión electrostática con la especie electroactiva ($[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$). Siguiendo con este razonamiento, se observa un aumento en la señal de los picos redox de esta especie cuando se incorpora el PAMAM sobre la superficie del electrodo, debido por un lado a la neutralización parcial de los grupos negativos del rGO-CMC con los grupos amino del dendrímero y gracias también a la estructura altamente permeable del mismo, que facilita una buena difusión del $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ hacia la superficie del electrodo. Por su parte, la inmovilización de la enzima produce una marcada disminución de la señal debido al carácter aislante de la capa enzimática así como al bloqueo de parte de la superficie y la estructura permeable con la enzima, lo que confirma la construcción del biosensor.

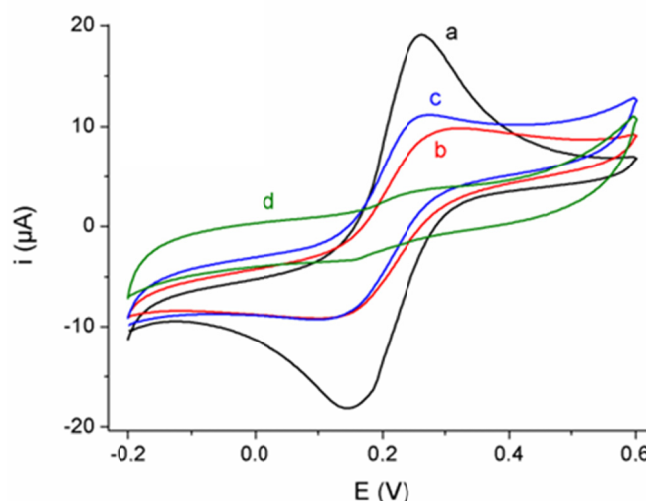


Figura 8.4 Caracterización del ensamblaje del biosensor Tyr/PAMAM/rGO-CMC/GCE mediante voltamperometría cíclica con $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 5 mM en KCl 100 mM. GCE (a), tras la incorporación del derivado rGO-CMC (b), con PAMAM (c), y tras la inmovilización de la enzima tirosinasa (d).

Por su parte, el segundo de los biosensores enzimáticos preparados con esta arquitectura se publicó en *Sensors and Actuators B-Chemical* [Borisova et al., 2016]. Este ensamblaje, mostrado en la **Figura 8.2**, también se caracterizó por técnicas electroquímicas, en este caso mediante espectroscopía de impedancia electroquímica. Mediante esta técnica se pudo ver como la incorporación del derivado de grafeno sobre la superficie del electrodo produce un aumento de la resistencia a la transferencia de carga, es decir, disminuye la conductividad, al igual que vimos mediante la técnica de voltamperometría cíclica. Al contrario que en el caso anterior, en este biosensor se observó como la capa de dendrímero provoca un aumento en la resistencia, lo que indica una disminución de la conductividad. De nuevo, de forma análoga al primer caso, la inmovilización de la enzima causa una fuerte disminución en la conductividad de la superficie biosensora, debido a la naturaleza aislante de la capa proteica (**Figura 8.5**).

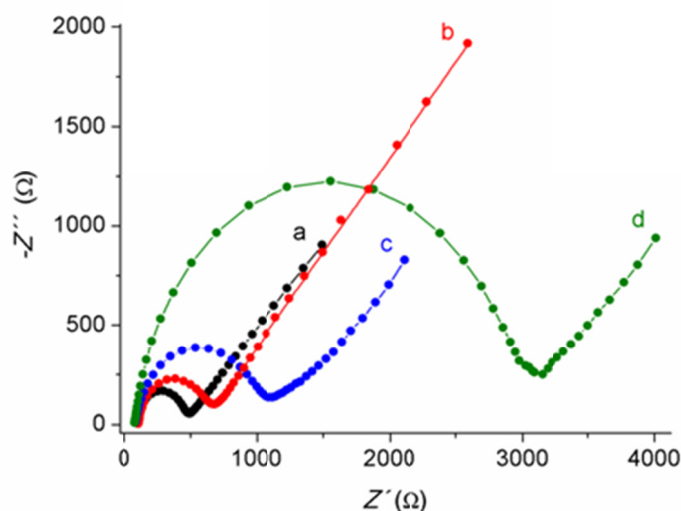


Figura 8.5 Diagramas de Nyquist de las distintas etapas de ensamblaje del biosensor. GCE (a), rGO-CMC/GCE (b), MNP-PAMAM-PtNP/rGO-CMC/GCE (c) y XO/MNP-PAMAM-PtNP/rGO-CMC/GCE (d) en $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 5 mM en KCl 100 mM.

El ensamblaje de ambos biosensores se caracterizó también mediante microscopía electrónica de barrido, de forma que si comparamos las capas compuestas por el dendrímero en los dos casos, según se muestra en la **Figura 8.6**, podemos observar las principales diferencias morfológicas de estos biosensores, consistentes en la deposición de numerosas nanopartículas sobre las láminas de grafeno, como se puede ver en la **Figura 8.6B**, mientras que en la **Figura 8.6A** se observan de forma nítida la estructura de las láminas de grafeno, con superficies planas y cortes bien definido.

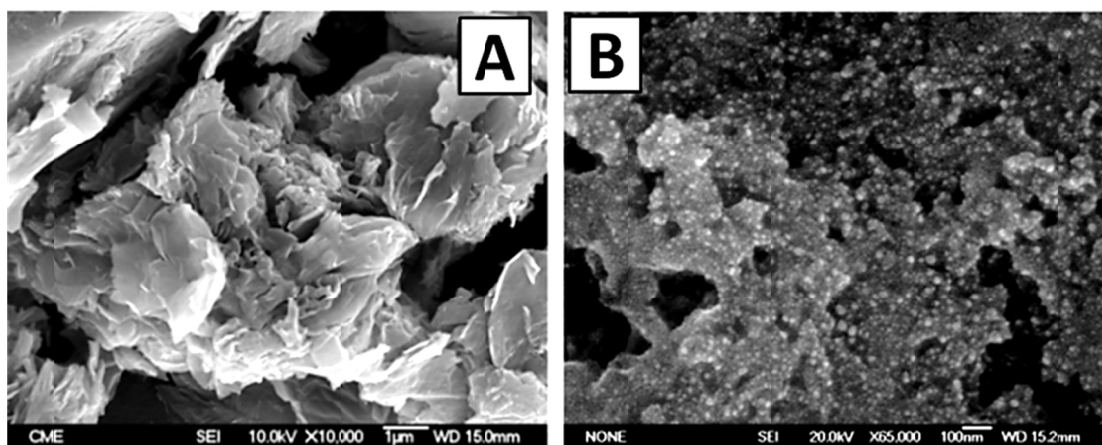


Figura 8.6 Imágenes de FE-SEM de electrodos de carbono vitrificado modificado con rGO-CMC y PAMAM G4 (A) y con rGO-CMC y MNP-PAMAM-PtNPs (B).

Estos dos diseños basados en interacciones electrostáticas entre el derivado de grafeno con CMC y una capa basada en el dendrímero PAMAM G4, muestran sus

evidentes diferencias morfológicas relacionadas con la presencia de nanopartículas magnéticas y metálicas. Con estas distintas estructuras se inmovilizaron las enzimas mediante entrecruzamiento con glutaraldehído. Con los biosensores completamente ensamblados, se evaluó otra de las características más importantes de las reacciones enzimáticas, la constante de Michaelis-Menten (K_M). Este parámetro da información sobre la concentración del sustrato que permite a la enzima alcanzar la mitad de la velocidad máxima de reacción. Valores bajos de K_M se traducen en una elevada afinidad de la enzima hacia el sustrato, lo que favorece que la reacción llegue a la mitad de la V_{max} a bajas concentraciones de sustrato [Segel, 1976].

Se determinaron los parámetros cinéticos enzimáticos, como el valor aparente de la constante de Michaelis-Menten (K_M^{app}) para las enzimas ancladas sobre la superficie del electrodo usando la versión electroquímica de la ecuación de Lineweaver-Burk [Bas et al., 2011; Teng et al., 2010].

Los resultados obtenidos con el electrodo Tyr/PAMAM/rGO-CMC/GCE para la transformación de catecol a 1,2-benzoquinona fueron un valor aparente de constante, K_M^{app} , de 1.2 μM , con una corriente aparente máxima, I_{MAX}^{app} , de 7.2 μA . Estos valores son muy inferiores a los valores de K_M publicados previamente [Singh et al., 2013; Zhou et al., 2014a; Vicentin et al., 2013; Ozoner et al., 2010]. Además, este valor resultó ser 200 veces inferior que el publicado para la enzima libre (240 μM) [Smith, 1962]. El bajo valor de K_M obtenido en este trabajo se puede explicar debido a que la oxidación de la 1,2-benzoquinona sobre la superficie del electrodo, transformándose en catecol, provoca un aumento local de la concentración del sustrato en las proximidades del biosensor, pudiendo generar una amplificación de la respuesta del electrodo, gracias a la reversibilidad de la reacción (Figura 8.7) [Fan et al., 2007].

Por su parte, los valores cinéticos obtenidos para el biosensor XO/MNP-PAMAM-PtNP/rGO-CMC/GCE fueron de una constante, K_M^{app} , de 9.0 μM y una corriente máxima, I_{MAX}^{app} , de 14.2 μA . De nuevo estos valores se encuentra por debajo de los obtenidos previamente por otros investigadores [Villalonga et al., 2012; Devi et al., 2011; Devi et al., 2012; Devi et al., 2013], así como un valor de K_M^{app} 3 veces inferior al valor descrito para la enzima libre [Zikakis et al., 1982].

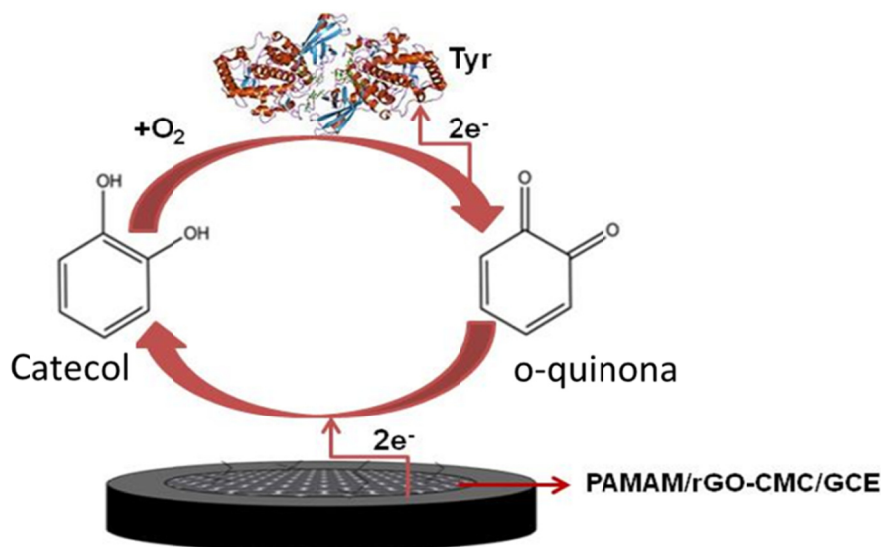


Figura 8.7 Representación esquemática del funcionamiento del biosensor enzimático basado en tirosinasa.

Estos resultados sugieren que estas novedosas bioplataformas sensoras construidas con arquitectura capa-a-capa, basadas en polímeros hidrofílicos, para la inmovilización de las enzimas, son unas excelentes estructuras para el diseño de biosensores enzimáticos, ofreciendo un buen microambiente para la reacción enzimática.

Otros de los parámetros que resultan interesantes a la hora de diseñar biosensores son la repetitividad y la reproducibilidad. En este sentido, ambos biosensores mostraron unos adecuados valores, donde tanto para el biosensor Tyr/PAMAM/rGO-CMC/GCE como para el XO/MNP-PAMAM-PtNP/rGO-CMC/GCE se obtuvo una reproducibilidad entre electrodos del 8.6 % de RSD, así como unos valores de repetitividad del 5.6 % de RSD para el Tyr/PAMAM/rGO-CMC/GCE y 3.2 % para XO/MNP-PAMAM-PtNP/rGO-CMC/GCE, para 10 medidas diferentes.

Una vez optimizada la preparación de los biosensores (cantidades de rGO-CMC, enzima, glutaraldehído y de la capa dendrímica) así como las condiciones de medida (pH y potencial) se evaluaron las características analíticas de estas novedosas bioplataformas, obteniéndose unos elevados valores de sensibilidad, de 6.9 A/M para el catecol con el biosensor Tyr/PAMAM/rGO-CMC/GCE y de 9.9 mA/M para la xantina con el XO/MNP-PAMAM-PtNP/rGO-CMC/GCE. Junto a estos datos, cabe resaltar tanto los bajos límites de detección obtenidos, de 0.9 y 13 nM para catecol y xantina, respectivamente, así como unos amplios intervalos lineales, que van de 2 nM a 400 nM para el catecol y de 50 nM a 12 μ M para la xantina. Estos altos valores están

relacionados con la alta cantidad de enzima inmovilizada sobre la superficie del electrodo, así como a la buena difusión de los analitos hacia la superficie del electrodo, que se ve favorecido por las estructuras tridimensionales desarrolladas.

En ambos casos se evaluó la selectividad de los biosensores desarrollados hacia los analitos seleccionados, de forma que en el caso del primer biosensor, preparado con la enzima tirosinasa, las especies estudiadas fueron ácido ascórbico, tirosina, ácido úrico, epinefrina, estriol y 17 β -estradiol a un nivel de concentración igual en todos los casos a 100 nM. Este biosensor solo mostró respuesta electroquímica hacia el catecol, siendo la señal en el resto de los casos despreciable, excepto para el 17 β -estradiol, que proporcionó una respuesta aproximadamente del 25% de la señal del catecol (**Figura 8.8**).

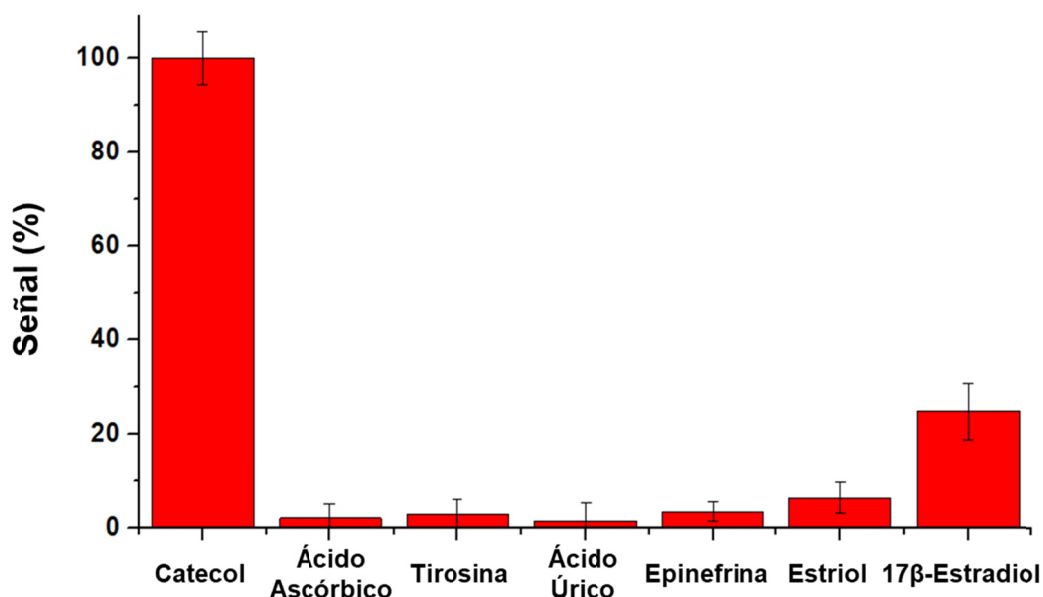


Figura 8.8. Ensayo de selectividad del biosensor Tyr/PAMAM/rGO-CMC/GCE hacia ácido ascórbico, tirosina, ácido úrico, epinefrina, estriol y 17 β -estradiol, frente a catecol, todos a una concentración de 100 nM.

Por su parte, para el biosensor XO/MNP-PAMAM-PtNP/rGO-CMC/GCE se evaluó su respuesta hacia xantina en presencia de otras especies en el medio. Estas especies estudiadas como interferentes fueron urea, glucosa, galactosa, cafeína y fructosa, a una concentración 100 veces superior a la de xantina y ácido úrico y ácido ascórbico, a una concentración 1000 veces inferior a la del analito. En este estudio, se pudo comprobar como urea, glucosa, galactosa, cafeína y fructosa no mostraron efecto en la señal obtenida para la xantina, a pesar de encontrarse a una concentración muy superior a esta pero como por el contrario, tanto el ácido úrico y sobre todo el ácido ascórbico si mostraron un efecto claramente marcado en cuanto a

la señal amperométrica obtenida (**Figura 8.9**). Esto se debe a que ambos ácidos pueden ser fácilmente oxidados al potencial de trabajo empleado (+600 mV) [Owens et al., 1978; Chairam et al., 2011; Villalonga et al., 2012; Wen et al., 2017]. Una posibilidad para reducir este efecto interferente sería trabajar a potenciales inferiores, donde el efecto de la oxidación de estos ácidos sea menos significativa, y esto sería posible ya que como se ha comentado anteriormente, la incorporación de las nanopartículas de platino en el diseño del biosensor permite ver una señal electroquímica de la oxidación de xantina a partir de 200 mV aproximadamente (**Figura 8.3**).

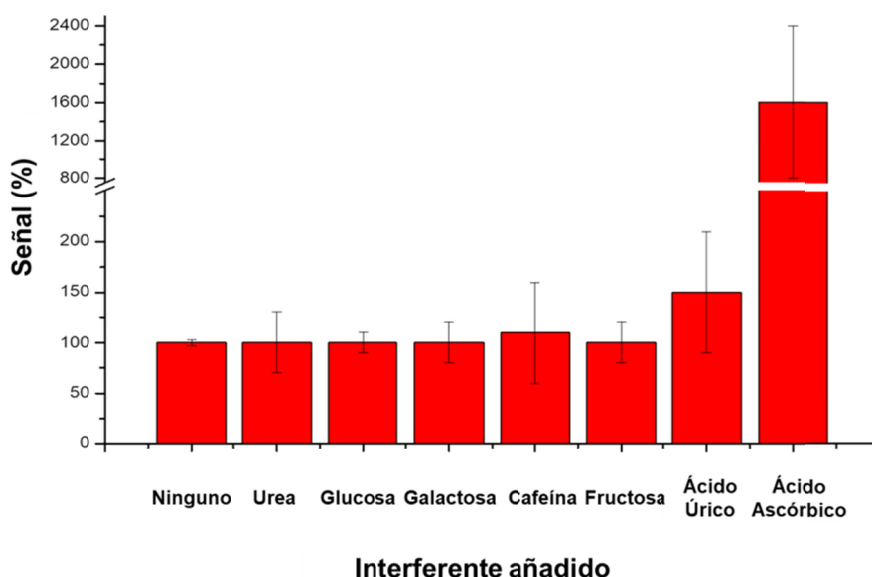


Figura 8.9 Efecto de la presencia de distintas especies (urea, glucosa, galactosa, cafeína, fructosa, ácido úrico, ácido ascórbico) en la señal amperométrica de xantina 10 μ M.

En cuanto a la estabilidad de almacenamiento de los biosensores enzimáticos preparados, se evaluó su almacenamiento a 4 °C en condiciones de sequedad. Cabe destacar que en el primero de ellos, Tyr/PAMAM/rGO-CMC/GCE, la señal ofrecida para la determinación de catecol fue del 93 % tras 40 días almacenados en esas condiciones, lo que puede deberse a una buena estabilización conformacional de la enzima, favorecido por su unión covalente multipuntual al dendrímero de PAMAM, el cual presenta un tamaño similar al enzimático, lo cual es una ventaja ya que provoca una menor deformación de la estructura proteica [Villalonga et al., 2014]. Además, gracias a la presencia de los nanomateriales hidrofílicos y biocompatibles, el entorno en el que se inmoviliza la enzima supone un buen ambiente para su estabilización.

Por otro lado, el biosensor para xantina, XO/MNP-PAMAM-PtNP/rGO-CMC/GCE, mostró una tendencia menos estable, con una pérdida gradual de su

respuesta electroquímica, disminuyendo hasta un 73 % de la señal inicial tras 4 semanas almacenado en frío y sequedad. Esta disminución, mostrando una menor estabilidad en comparación con el primer biosensor descrito, puede deberse al empleo de un mayor potencial de trabajo, ya que el potencial seleccionado como óptimo en este trabajo fue de 600 mV, mientras que en el biosensor para catecol fue de -200 mV. Este potencial elevado, como se ha comentado anteriormente, puede acarrear una disminución en la estabilidad de los sensores, ya que se está sometiendo a condiciones más extremas, lo que repercute en su estabilidad. Aun así, y teniendo en cuenta la alta sensibilidad del biosensor desarrollado (9.9 mA/M) y el bajo límite de detección que muestra (13 nM) podemos considerar que un 73 % de la señal tras 4 semanas es un buen valor de estabilidad.

Finalmente, estos biosensores enzimáticos amperométricos se aplicaron a muestras reales, por un lado a la determinación de fenoles en muestras de infusiones y por el otro a la cuantificación de xantina en pescado como parámetro de frescura. Los resultados obtenidos en ambos casos se validaron por comparación con técnicas bien establecidas, como el método colorimétrico estándar de Folin-Ciocalteu para la determinación de fenoles totales [Sulaiman et al., 2014], usando catecol como patrón, o HPLC para la cuantificación de xantina en muestras de pescado (Tabla 8.1), donde se pudo ver que los sensores desarrollados son adecuados para determinar cada uno de los analitos en las muestras seleccionadas. En ambos casos, la respuesta frente a los métodos estándar se ajustó de una forma correcta, lo que sugiere la aplicabilidad de los biosensores desarrollados para un análisis rápido, sencillo y fiable.

Tabla 8.1 Contenido en xantina en muestras de pescado tras 5 días de descomposición.

Método	Concentración (mM)*	Concentración (μmol/g muestra)*
Biosensor	1.0 ± 0.1	3.1 ± 0.4
HPLC	1.28 ± 0.01	3.86 ± 0.03

* Media ± SD de 3 medidas.

El comportamiento analítico obtenido con estos dos biosensores electroquímicos contruidos con estructura capa-a-capa a partir del derivado de grafeno rGO-CMC combinado con una capa dendrímica con base de PAMAM G4 ha mostrado muy buenas características en cuanto a elevada sensibilidad, bajo límite de detección, buena estabilidad de almacenamiento, mediante una técnica simple y rápida, comparada con otros métodos oficiales de análisis. Estos resultados demuestran la utilidad de esta arquitectura 3D nanoestructurada en el diseño de biosensores electroquímicos enzimáticos.

8.2 Biosensores de afinidad contruidos a partir de nanomateriales híbridos

En esta sección se recogen cuatro biosensores desarrollados para la determinación de levaduras en vinos basados en nanomateriales funcionalizados con biorreceptores de afinidad. Este tipo de sensores están siendo muy empleados en la actualidad en la obtención de información relativa a compuestos a niveles de traza relacionados con la seguridad alimentaria [Campuzano et al., 2017].

En este trabajo se han preparado dos inmunosensores amperométricos empleando electrodos serigrafiados de carbono modificados con derivados de grafeno como superficies transductoras, los cuales han servido además como material de inmovilización de los anticuerpos específicos de los analitos seleccionados, esto son, las levaduras *Brettanomyces bruxellensis* y la *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales pueden presentarse como contaminantes en muestras de vino. Ambos trabajos han sido publicados en la revista Analytical and Bioanalytical Chemistry [Borisova et al., 2017; Borisova et al., 2018].

Finalmente, en el tercer trabajo recogido en esta sección, publicado en la revista Sensors and Actuators B: Chemical [Villalonga et al., 2019], se presentan dos biosensores amperométricos de afinidad que emplean nuevamente electrodos serigrafiados de carbono como transductor y nanopartículas magnéticas protegidas con una cubierta de sílice (NanoCaptors) y funcionalizadas con la lectina Concanavalina A (ConA), que se adquieren de forma comercial, o esas mismas nanopartículas magnéticas modificadas con el anticuerpo específico de la *Brettanomyces bruxellensis*. De esta forma se obtuvieron otros dos nuevos sensores para el análisis de levaduras en vino, empleando nanopartículas magnéticas como elementos de captura y aislamiento de los analitos de interés.

La estrategia seguida en todos los casos consistió en una diseño tipo sándwich, empleando el complejo Concanavalina A-peroxidasa (ConA-HRP) como elemento de marcaje y señalización de la levadura, debido a la alta afinidad de la lectina concanavalina hacia las manoproteínas de la pared celular de las levaduras [Tkacz et al., 1971], y la habilidad de la enzima HRP para producir una señal amperométrica en presencia de hidroquinona y H_2O_2 como se muestra en la **Figura 8.10**. [Borisova et al., 2017; Eletxigerra et al., 2016]. Debido a que las reacciones de biorreconomiento basadas en afinidad son difícilmente reversibles, estos biosensores solo se pueden usar en una única medida, por lo que todos estos estos biosensores se

desarrollaron sobre electrodos serigrafiados de carbono desechables, cordialmente donados por la empresa Orion High Technologies S.L. (OHT-000).

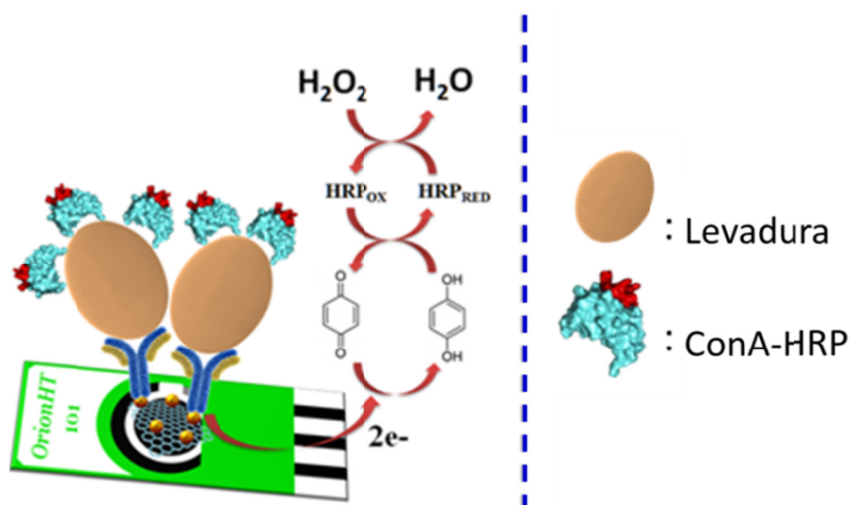


Figura 8.10 Ensamblaje tipo sándwich basado en el complejo ConA-HRP como elemento de marcaje y señalización, desarrollado sobre electrodos serigrafiados.

En el caso de los dos inmunosensores preparados a partir de derivados de grafeno, al igual que en los biosensores enzimáticos preparados anteriormente, inicialmente se procedió a la preparación de los derivados de grafeno y la posterior modificación del electrodo de carbono de trabajo de un electrodo serigrafiado con los mismos. Para el desarrollo de estos biosensores, los derivados de grafeno empleados fueron óxido de grafeno reducido decorado con nanopartículas de oro (Au-rGO) y un derivado de óxido de grafeno reducido enriquecido en grupos carboxílicos (COOH-rGO) (**Figura 8.11**).

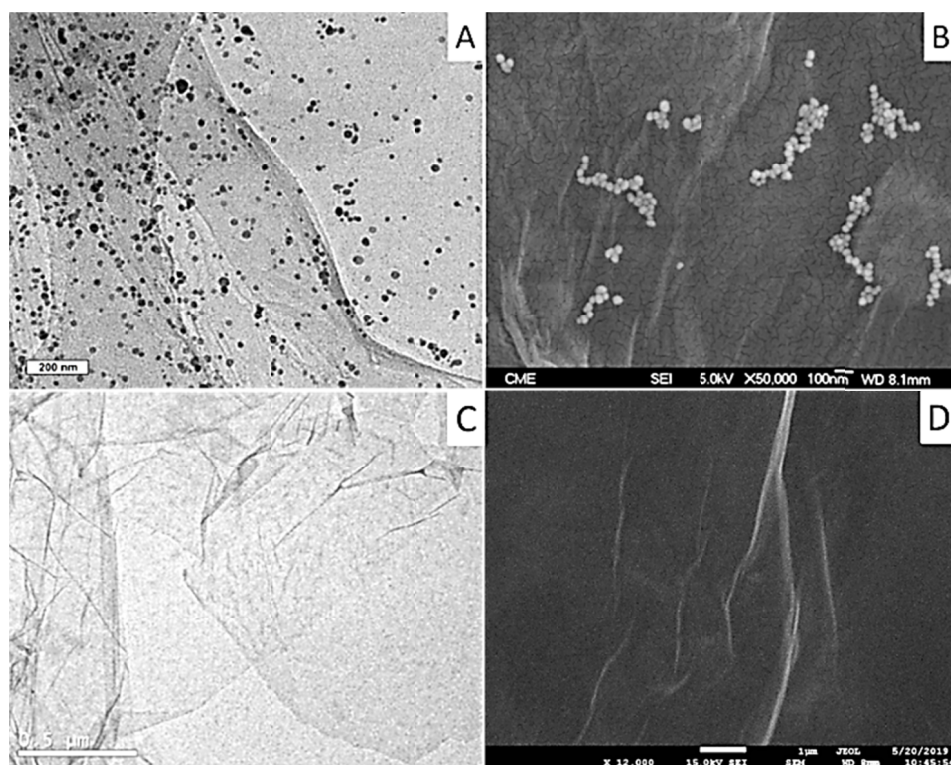


Figura 8.11 Imágenes de los derivados de grafeno, (A) Au-rGO mediante TEM, (B) Au-rGO mediante SEM; (C) COOH-rGO mediante TEM y (D) COOH-rGO mediante SEM.

En la **Figura 8.11** se puede ver la presencia de nanopartículas de oro distribuidas por la superficie de las láminas de grafeno en el derivado Au-rGO por microscopía electrónica tanto de transmisión como de barrido, mientras que se observa la estructura plana corrugada típica del grafeno en las imágenes correspondientes al derivado COOH-rGO.

La estrategia seguida en la preparación de los dos inmunosensores basados en derivados de grafeno se muestra en la **Figura 8.12**, donde se puede ver que en una primera etapa se modifica el electrodo de trabajo de un electrodo serigrafiado de carbono con el correspondiente derivado de grafeno mediante “drop-casting”, es decir, a través de la deposición de una gota de la disolución del derivado de grafeno y su posterior secado. A continuación, en el caso del derivado Au-rGO, se funcionaliza la superficie de oro con grupos carboxílicos, empleando el ácido 3-mercaptopropiónico, para posteriormente, en ambos casos, activar los grupos carboxílicos presentes con carbodiimida/succinimida y anclar así el anticuerpo de captura correspondiente.

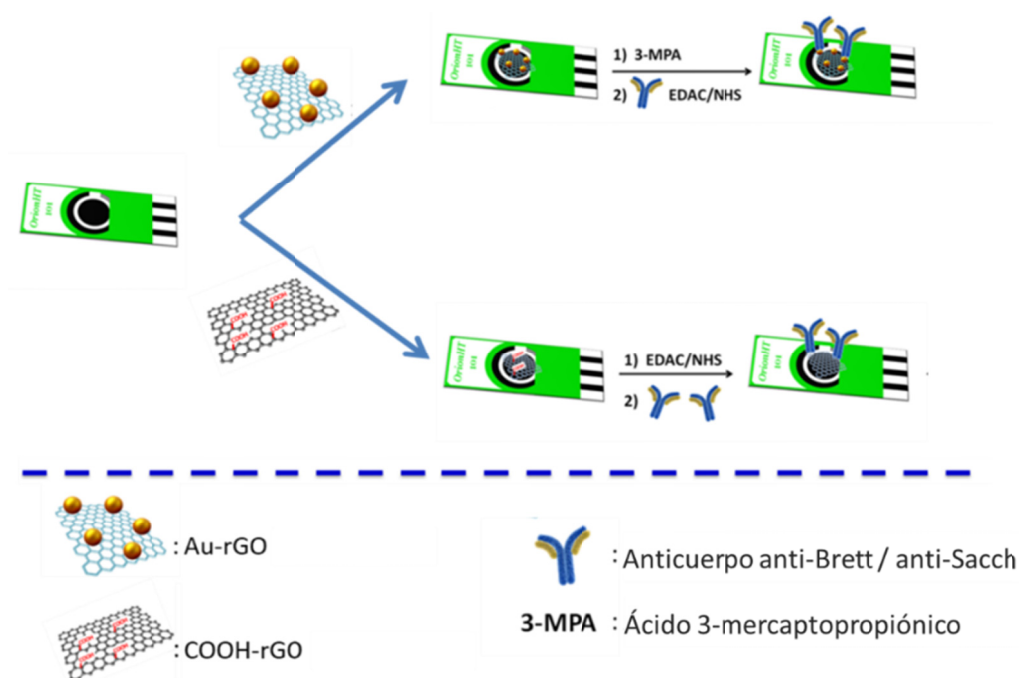


Figura 8.12 Representación esquemática del ensamblaje de los inmunosensores desarrollados para la detección de *Brettanomyces bruxellensis* y *Saccharomyces cerevisiae* sobre electrodos serigrafados de carbono.

Esta estrategia permite anclar el anticuerpo a través de los grupos carboxílicos presentes en los nanohíbridos, los cuales se encuentran distribuidos por toda la superficie del electrodo, quedando parte de la superficie del grafeno sin modificar, lo cual es ventajoso a la hora de realizar la detección electroquímica, ya que la superficie no se encuentra completamente bloqueada por estas biomacromoléculas.

El primero de los inmunosensores desarrollados en esta tesis doctoral se ensambló sobre electrodos serigrafados de carbono desechables, como se ha indicado anteriormente, empleando un nanomaterial híbrido consistente en un derivado de óxido de grafeno reducido decorado con nanopartículas de oro, el cual se preparó inicialmente a partir de óxido de grafeno de acuerdo al procedimiento mostrado en la **Figura 8.13**. Esta síntesis consiste en la funcionalización del GO con 3-mercaptopropiltrimetoxisilano, que se va a unir a través de grupos hidroxilos presentes en el GO. A continuación se añade borhidruro sódico que va a reducir al GO, manteniendo libres los grupos tiol incorporados, para su unión a nanopartículas de oro.

Posteriormente, una vez modificado el electrodo de trabajo con el nanohíbrido, se funcionalizan las nanopartículas de oro con ácido 3-mercaptopropiónico, el cual se une al oro mediante un enlace covalente dativo entre el oro y el azufre, dejando

expuestos grupos carboxílicos, los cuales se van a activar para finalmente inmovilizar el anticuerpo policlonal específico de *Brettanomyces bruxellensis*.

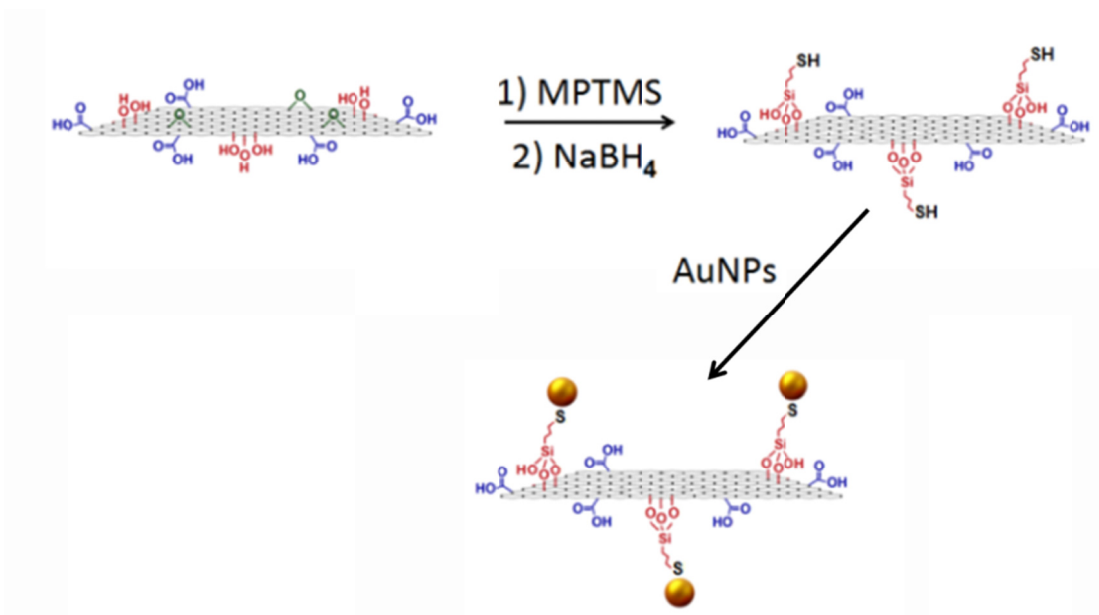


Figura 8.13 Etapas de la preparación del derivado Au-rGO.

La modificación de las nanopartículas de oro con grupos carboxílicos fue confirmada mediante su espectro de ATR-FTIR, donde aparecen las bandas características a 1700 y 1715 cm^{-1} (**Figura 8.14**). Estas bandas pueden relacionarse con la vibración de tensión del enlace C=O , correspondiente a los residuos de ácido 3-mercaptopropiónico así como a grupos carboxílicos de los bordes de las láminas de grafeno, respectivamente.

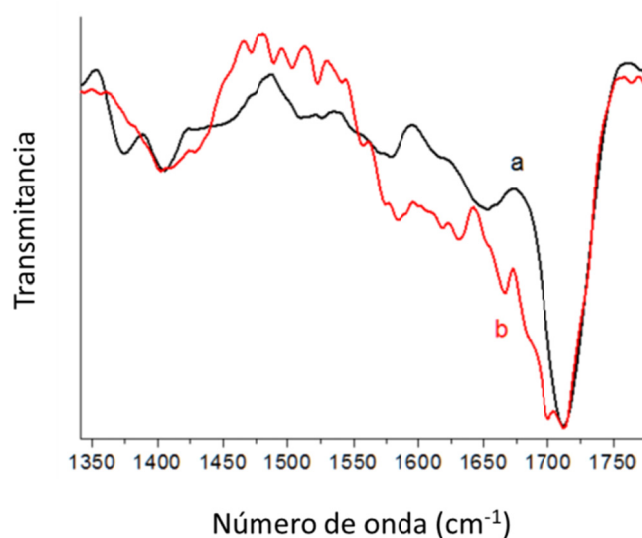


Figura 8.14 Espectros de ATR-FTIR del electrodo serigrafiado de carbono modificado con el derivado Au-rGO antes (a) y después (b) de modificarlo con el ácido 3-mercaptopropiónico.

En el caso del segundo inmunosensor desarrollado, (aSAb/COOH-rGO/SPE), el derivado de grafeno empleado es un producto comercial, el cual fue cordialmente donado por la empresa Orion High Technologies S.L. (GFO-34). Dicho derivado presenta grupos funcionales carboxílicos, que se emplearan en la inmovilización del anticuerpo específico anti-Saccharomyces mediante activación con carbodiimida/succinimida.

Estos inmunosensores se emplearon para la determinación de *Brettanomyces bruxellensis* en vino tinto y de *Saccharomyces cerevisiae* en vino blanco, respectivamente, mediante una arquitectura tipo sándwich, empleando para marcar y señalar a la levadura el complejo ConA-HRP, como se ha indicado anteriormente (**Figura 8.10**).

Una de las razones del uso de esta arquitectura tipo sándwich es la de evitar las uniones inespecíficas sobre la superficie del electrodo de otras levaduras o macromoléculas, e incluso el complejo ConA-HRP empleado en el marcaje y señalización, que puedan afectar a la medida amperométrica. Con el fin de evitar estas adsorciones inespecíficas, generalmente se emplean distintos reactivos conocidos como agentes de bloqueo, y cuya función es la de formar una ligera capa sobre la superficie electródica que evite la adsorción inespecífica de todo aquello que pueda producir una señal electroquímica medible junto con nuestro analito. Esto incluye la adsorción inespecífica del propio analito u otros interferentes presentes en la muestra, así como del agente de marcaje [Zhang and Heller, 2005]

Para ello, las características que deben cumplir los agentes de bloqueo son, que sean capaces de inhibir las interacciones inespecíficas, sin mostrar reactividad con el resto de componentes que intervienen en el ensayo (anticuerpos, proteínas), que no sean capaces de interrumpir las interacciones entre el biorreceptor y el analito, etc. Algunas de las sustancias más empleadas como agentes de bloqueo son detergentes (Tween-20, Triton X-100), proteínas (Albumina de suero bovino (BSA), Caseína, Gelatina de pescado, Suero completo) o polímeros (Polietilenglicol, Polivinilalcohol, Polivinilpirrolidona, Ácido Poliacrílico) [Zhang and Heller, 2005].

En el diseño de estos dos inmunosensores amperométricos se evaluó el uso de BSA como agente de bloqueo con el fin de minimizar la respuesta electroquímica inespecífica. Cabe destacar en este sentido, el distinto comportamiento en ambos casos, ya que como se puede ver en la **Figura 8.15A** en el inmunosensor aSAb/Au-rGO/SPE, la señal electroquímica relativa obtenida, calculada como el cociente entre la señal del analito (específica) y en ausencia de analito (inespecífica) no se vio

afectada significativamente por el uso de BSA al 1 % (p/v), lo que sugiere que el nanomaterial híbrido empleado previene la adsorción inespecífica de la levadura u otras sustancias sobre la superficie del electrodo [Shi et al.,1999; Roach et al.,2005; Mao et al.,2010; Riquelme et al., 2016; Borisova et al., 2017]. Sin embargo, en el caso del inmunosensor aSAb/COOH-rGO/SPE si se pudo ver como el empleo de este agente bloqueante afecta de una forma importante en la respuesta relativa (**Figura 8.15B**).

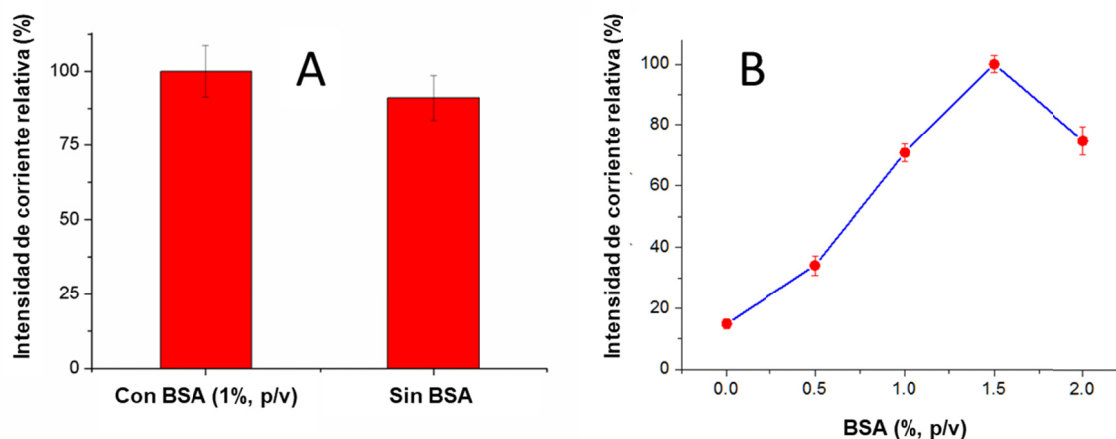


Figura 8.15. Efecto del uso de BSA (1%) como agente de bloqueo sobre la señal amperométrica del inmunosensor aBAb/Au-rGO/SPE frente a 10^3 UFC/ mL Brett (**A**); y de distintas concentraciones de BSA en la señal amperométrica del inmonosensor aSAb/COOH-rGO/SPE frente a 10^4 UFC/ mL Sacch (**B**).

Este distinto comportamiento puede deberse, a que en el nanohíbrido Au-rGO, los grupos funcionales ácidos se encuentran sobre la superficie de las nanopartículas de oro, que como se ha visto en la imagen de TEM (**Figura 8.11**) se encuentran distribuidas por la superficie del grafeno, acumulándose en determinadas zonas principalmente. Este hecho hace que al inmovilizar el anticuerpo específico para la levadura a través de estos grupos funcionales, este se encuentre localizado principalmente en zonas concretas, mientras que el resto de la superficie de óxido de grafeno reducido se encuentra libre de modificaciones. De esta forma tenemos por un lado los anticuerpos en zonas concretas y de pequeño tamaño, ya que las nanopartículas de oro son de unos 20 nm, de forma que si este anticuerpo reconoce a una levadura, de un tamaño muy superior, estará bloqueando el resto de grupos funcionales presentes en esa zona del nanomaterial, por lo que por el otro lado, la superficie que queda expuesta del biosensor será una superficie de grafeno sin grupos funcionales, lo cual representa un material ventajoso de cara a las adsorciones

inespecíficas, ya que como han demostrado otros autores este material inhibe dichas adsorciones [Lichtenberg et al.,2019; Riquelme et al.,2016].

Por su parte, el derivado COOH-rGO presenta grupos ácidos distribuidos por toda su superficie, y además, estos grupos se activan con carbodiimida/succinimida para inmovilizar el anticuerpo específico, de forma que los grupos que queden libres se encuentran activados y pueden unirse a otras proteínas o moléculas, por esta razón, en este caso es más importante realizar una etapa de bloqueo, que como se ha visto en la **Figura 8.15B** resulta esencial en el correcto funcionamiento del biosensor. En este caso, se empleó BSA como agente de bloqueo, optimizándose la concentración del mismo, resultando mejores resultados al bloquear con una disolución de BSA al 1 % p/v, resultados similares a los descritos en bibliografía [Riquelme et al., 2016; Wang et al., 2014].

Una vez optimizada la preparación de los inmunosensores, se evaluaron las características analíticas frente a sus analitos específicos, de forma que para el inmunosensor aBAb/Au-rGO/SPE se obtuvo un intervalo lineal de $10 - 10^6$ UFC /mL Brett (10 réplicas, $r = 0.989$), para un calibrado de disoluciones patrón, de acuerdo a la ecuación:

$$i_c \text{ (nA)} = 159.1 \times \log [\text{Brett}] - 49.7 \quad \text{Ecuación 1}$$

A continuación, se validó el inmonuensayo frente a muestras reales de vino tinto, comparando los resultados con los obtenidos mediante el método clásico de crecimiento y conteo, para lo que se evaluó la respuesta del inmunosensor frente a distintas concentraciones de Brett en muestras de vino tinto no diluido (Ribera del Duero, España), obteniéndose así un intervalo lineal de $10^2 - 10^6$ UFC/mL Brett (10 réplicas, $r = 0.988$), de acuerdo a la ecuación:

$$i_c \text{ (nA)} = 9.6 \times \log [\text{Brett}] + 30.0 \quad \text{Ecuación 2}$$

Como se puede observar al comparar ambas pendientes, el inmunosensor desarrollado muestra un marcado efecto matriz para las muestras de vino tinto, resultando en una disminución de la sensibilidad en estas muestras, pero que aun así es suficiente para permitir la adecuada determinación de la levadura *Brettanomyces bruxellensis* en este medio, ya que el límite de detección es de 56 UFC/mL Brett, inferior a 10^3 UFC/mL Brett, que se considera el límite para que esta levadura produzca un efecto adverso en la calidad del vino [Cecchini et al., 2012]. Cabe

destacar que este valor de límite de detección, calculado según el criterio de $3S_b/m$, es inferior al descrito mediante análisis directo y en tiempo real por PCR [Cocolin et al., 2004; Tofalo et al., 2015; Manzano et al., 2016]

En cuanto al inmunosensor aSAb/COOH-rGO/SPE, tanto en disoluciones patrón como en muestras de vino blanco sin diluir (Don Simón, Spain), el intervalo lineal obtenido fue entre $10 - 10^7$ UFC/mL Sacch. De esta forma, tras medir 10 réplicas, las rectas de calibrado obtenidas fueron en el caso de disoluciones patrón ($r = 0.998$):

$$i_c \text{ (nA)} = 5.7 \cdot x \log [\text{Sacch}] - 2.4 \quad \text{Ecuación 3}$$

Y para muestras de vino blanco mediante el método de adiciones estándar ($r = 0.995$):

$$i_c \text{ (nA)} = 7.1 \cdot x \log [\text{Sacch}] + 13.2 \quad \text{Ecuación 4}$$

La comparación estadística de ambas pendientes mostró la existencia de efecto matriz en la muestra de vino blanco. En cuanto a los límites de detección obtenidos fueron 4 y 6 UFC/mL Sacch respectivamente, aplicando el criterio de $3S_b/m$.

La reproducibilidad de estos biosensores desarrollados, para 10 electrodos preparados en cada caso, resultó en un 12.3 % y un 16.3 % para los inmunosensores aBAb/Au-rGO/SPE y aSAb/COOH-rGO/SPE respectivamente, analizando las levaduras directamente en la muestra de vino.

Posteriormente, se evaluó la selectividad de los inmunosensores, donde debido a la alta especificidad de los anticuerpos se esperaba que estos inmunosensores mantuviesen una buena selectividad hacia la levadura específica. Este estudio se realizó en el caso del inmunosensor aBAb/Au-rGO/SPE frente a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, esta misma levadura inactivada térmicamente y la *Pichia pastoris*, mientras que las levaduras evaluadas en el caso del inmunosensor aSAb/COOH-rGO/SPE fueron *Zygosaccharomyces fermentati*, *Hanseniaspora uvarum* y *Torulaspora delbrueckii* [Jolly et al., 2014; Tristezza et al., 2016; Kilcast y Subramaniam, 2011]. Como se puede ver en la **Figura 8.16**, ambos biosensores respondieron de forma específica a la levadura para la que están diseñados, mientras que no mostraron respuesta para el resto de levaduras.

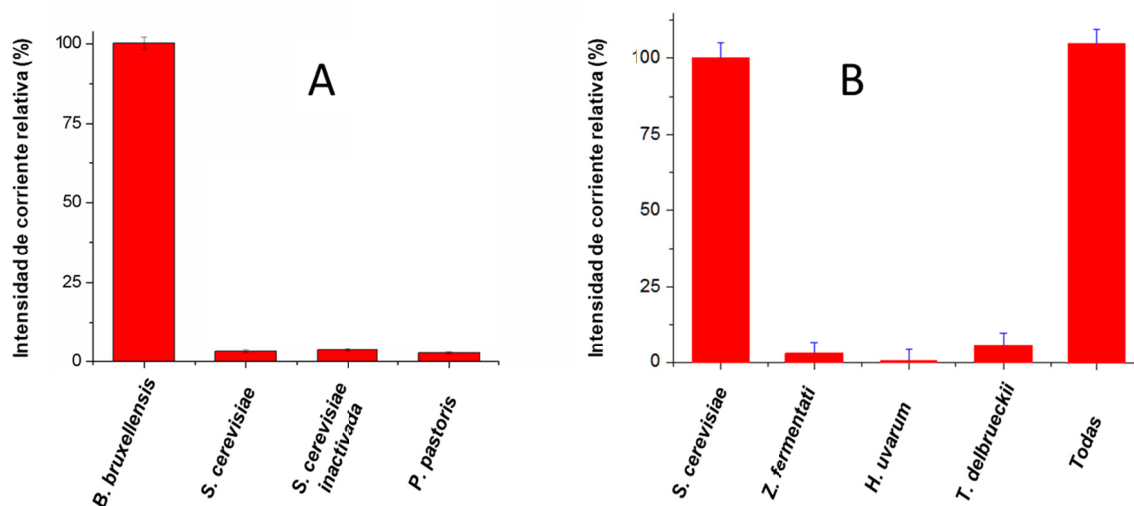


Figura 8.16. Respuesta del inmunosensor aBAb/Au-rGO/SPE frente a 10^5 UFC/mL de distintas levaduras (A); y del inmonosensor aSAb/COOH-rGO/SPE frente a 10^4 UFC/ mL de distintas levaduras (B).

También se evaluó la estabilidad de almacenamiento de los inmunosensores desarrollados, almacenándolos en condiciones de sequedad a 4 °C. Como se puede observar en la **Figura 8.17**, para ambos casos, estos inmunosensores mantienen más del 90 % de la actividad electroanalítica inicial tras 3 semanas. Este hecho puede deberse a que los nanomateriales empleados en el diseño de estos sensores facilitan la correcta inmovilización de los anticuerpos en la superficie electródica, aportando un ambiente adecuado para los anticuerpos, debido al carácter hidrofílico que aportan los grupos carboxílicos, los cuales además puede aportar estabilidad estructural a los anticuerpos debido a su carga negativa. Por su parte, en el caso del aSAb/COOH-rGO/SPE, el BSA empleado como agente de bloqueo también puede aportar un efecto estabilizador hacia la estructura tridimensional del anticuerpo.

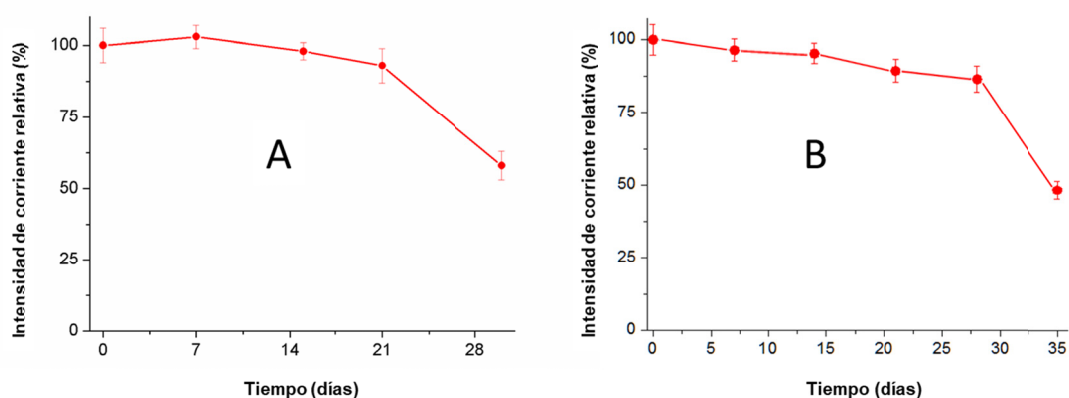


Figura 8.17. Efecto del tiempo de almacenamiento a 4 °C en condiciones secas del inmunosensor aBAb/Au-rGO/SPE (A); y del inmonosensor aSAb/COOH-rGO/SPE (B).

Finalmente, el inmunosensor aSAb/COOH-rGO/SPE se validó mediante el análisis de muestras de vino blanco enriquecidas con una concentración de $8.4 \cdot 10^4$ UFC/mL Sacch, comparando los resultados con los obtenidos mediante el método convencional de crecimiento y conteo, utilizando una cámara de conteo de células, tras la coloración de la levadura con azul de metileno [Escot et al., 2001]. Los resultados obtenidos fueron de $(81\,400 \pm 500)$ UFC/mL mediante el inmunosensor, frente a $(85\,200 \pm 300)$ UFC/mL que proporcionó el método clásico, lo que supone un valor del 95.5 % de recuperación con el método desarrollado, lo que demuestra la aplicabilidad de este biosensor en la rápida determinación de la levadura.

Cabe destacar, que según la bibliografía más reciente, el inmunosensor electroquímico desarrollado aquí para la determinación de *Brettanomyces bruxellensis* es el primer biosensor amperométrico descrito para la determinación de esta levadura en muestras de vino, que a pesar del interés que supone la rápida determinación de esta levadura debido a las grandes pérdidas económicas que supone para la industria del vino, hay un escaso avance en el desarrollo de dispositivos portátiles, de fácil uso y rápidos [Wedral et al., 2010].

En el último de los trabajos realizados, publicado en la revista *Sensors and Actuators B-Chemical* [Villalonga et al., 2019], se desarrollaron 2 biosensores amperométricos similares a los dos anteriores, empleando en este caso nanopartículas magnéticas recubiertas de una corteza de sílice (NanoCaptors) y funcionalizadas con el biorreceptor específico para la determinación de levaduras en muestras de vino. En este trabajo, por un lado se emplearon NanoCaptors funcionalizados con ConA, cordialmente donados por la empresa Orion High Technologies S.L. (NCR-80A), los cuales se emplearon para la determinación de levaduras totales en muestras de vino tinto. Esto es posible, como se ha indicado anteriormente, gracias a la afinidad de la lectina Con A hacia las manoproteínas de la pared celular de las levaduras [Tkacz et al., 1971]. Se empleó como modelo de levaduras totales la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Por otro lado, se modificaron NanoCaptors funcionalizados con grupos isocianato, cordialmente donados por la empresa Orion High Technologies S.L. (NCR-02A), con el anticuerpo específico para la *Brettanomyces bruxellensis*, obteniéndose así unas nanopartículas de captura específicas para esta levadura.

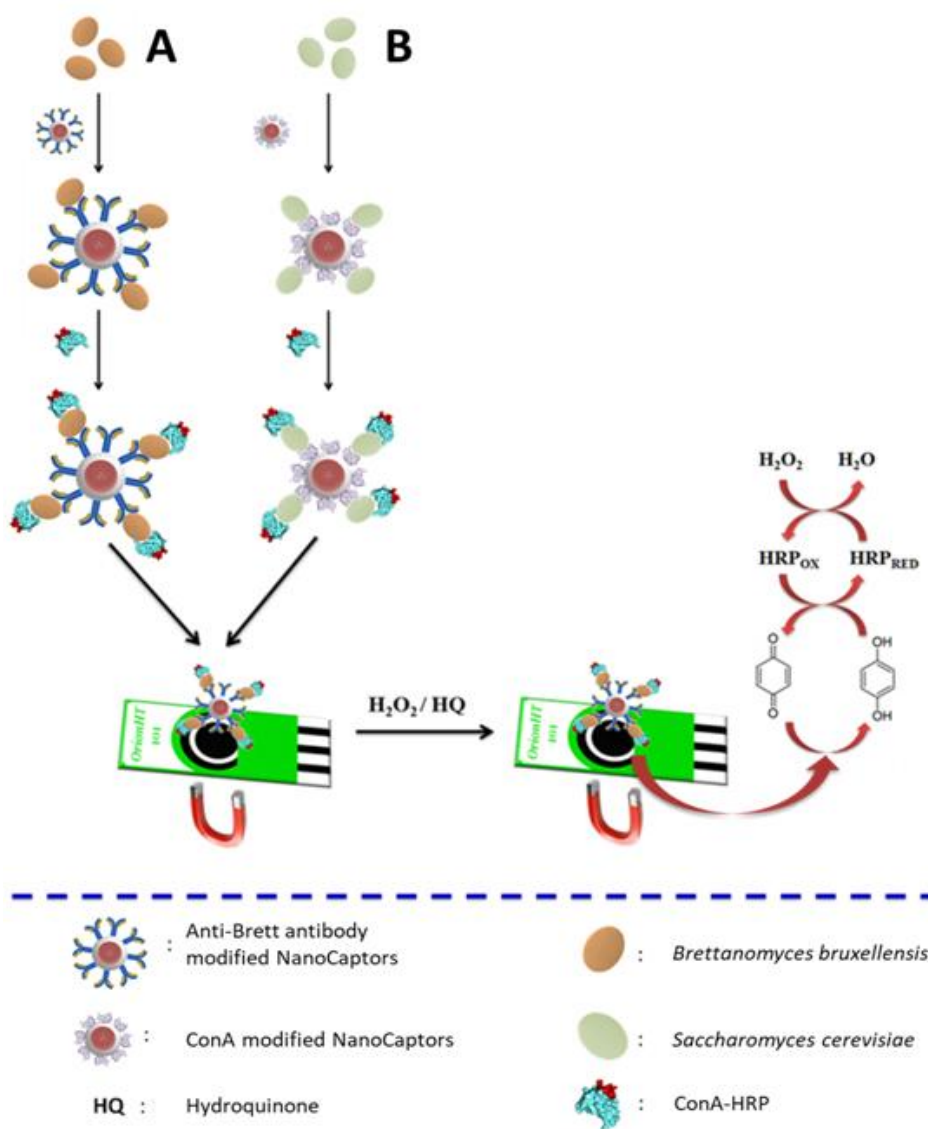


Figura 8.18. Representación esquemática de la metodología empleada para la determinación de *Brettanomyces bruxellensis* (A); y de levadura total (B).

La metodología descrita aquí se basa en una primera etapa de captura de las levaduras presentes en la muestra de vino tinto con las partículas magnéticas funcionalizadas. Tras lavar este complejo, se ponen a reaccionar con una disolución de ConA-HRP, que al igual que en los anteriores inmunosensores se empleará para el marcaje y señalización amperométrica de las levaduras. A continuación, estas nanopartículas, junto con las levaduras y el complejo ConA-HRP se depositan con ayuda de un imán sobre la superficie de un electrodo desechable serigrafiado de carbono (**Figura 8.18**).

Las nanopartículas empleadas en este trabajo como elementos de captura consisten en un núcleo de Fe_3O_4 de un tamaño aproximado de (240 ± 22) nm cubierto

por una capa de SiO₂ de aproximadamente (90 ± 11) nm, dando un tamaño total de nanopartícula de (415 ± 33) nm. En la **Figura 8.19** se muestran imágenes representativas de microscopía electrónica TEM y FE-SEM de este nanomaterial.

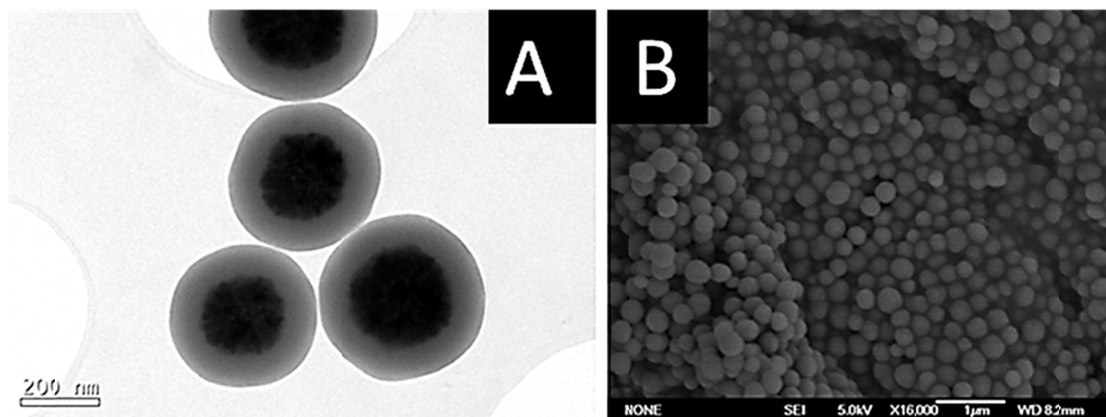


Figura 8.19. Imagen TEM (A) y FE-SEM (B) de los NanoCaptors con estructura núcleo@corteza de Fe₃O₄@SiO₂.

Para desarrollar el biosensor para la levadura *Brettanomyces*, como se acaba de indicar, inicialmente es necesario modificar la superficie de los NanoCaptors con el anticuerpo específico. La inmovilización covalente del anticuerpo se realiza incubando NanoCaptors funcionalizados con 3-propilisocianato con el anticuerpo anti-Brett a 4 °C, permitiéndose así la reacción entre los grupos isocianato de las nanopartículas y los amino del anticuerpo. A continuación, los grupos isocianato libres de la superficie de las nanopartículas se bloquean con caseína.

Las características analíticas de los inmunosensores propuestos se evaluaron tras optimizar los parámetros de medida, tales como cantidad de partículas, tiempo de incubación con la muestras, o tiempo de incubación con el conjugado ConA-HRP. De forma análoga a los inmunosensores preparados a partir de derivados de grafeno, se evaluó el comportamiento de los biosensores tanto para el contenido total de levaduras como para la *Brettanomyces* en disoluciones patrón así como en muestras de vino tinto comercial sin diluir (Ribera del Duero, España). En todos los casos, el intervalo lineal obtenido fue 10 - 10⁶ UFC/mL. En el caso de la levadura Brett, realizando 10 réplicas en cada medio se obtuvieron los siguientes ajustes para muestras patrón y en vino tinto respectivamente (**Figura 8.20**):

$$i_c (\mu A) = 0.348 \times \log [Brett] - 0.198 \quad (r = 0.983) \quad \text{Ecuación 5}$$

$$i_c (\mu A) = 0.341 \times \log [Brett] + 1.542 \quad (r = 0.995) \quad \text{Ecuación 6}$$

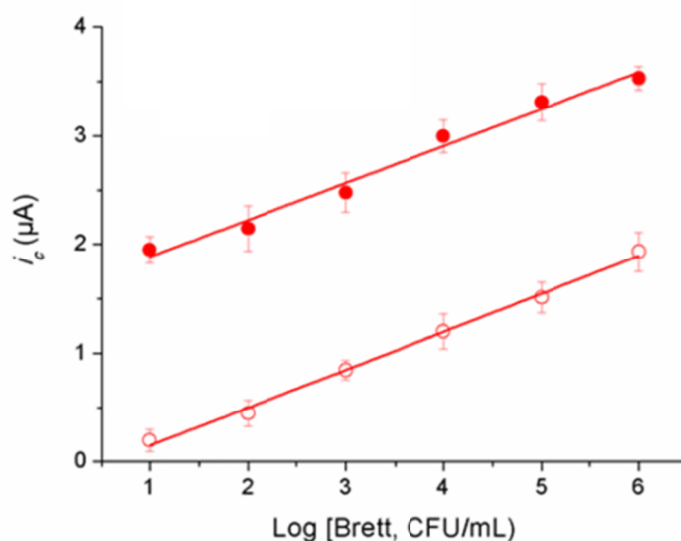


Figura 8.20 Curvas de calibrado del biosensor para Brett en disoluciones patrón (círculos blancos) y en muestras de vino tinto comercial (círculos rojos).

Los resultados obtenidos muestran que no hay un efecto matriz en esta muestra, obteniéndose unos bajos valores de límite de detección, de 6 UFC/mL y 10 UFC/mL en disolución reguladora de pH y muestra de vino tinto, respectivamente, calculado según el criterio de $3S_b/m$. Según estos datos, este biosensor permite detectar concentraciones de Brett inferiores a otros métodos descritos empleando PCR [Versavaud et al., 1995; Delaherche et al., 2004; Tofalo et al., 2015], y son similares a los obtenidos en el trabajo previo de nuestro grupo empleando electrodos serigrafados de carbono desechables modificados con un derivado de grafeno [Borisova et al., 2017]. Como se indicó anteriormente, estos valores de límite de detección son inferiores a los que la Brett genera propiedades indeseadas al vino, que es de 10^3 UFC/mL [Cecchini et al., 2012] lo que hace pensar en la aplicabilidad de este sensor en la industria del vino.

En cuanto al biosensor para la determinación de levaduras totales, como se ha indicado anteriormente, se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como levadura modelo debido a su amplio uso en la industria del vino, que hace esperar que sea la más abundante en este tipo de muestras. Se llevó a cabo la determinación de esta levadura en disoluciones patrón y en muestras de vino tinto comercial sin diluir realizando 10 réplicas en cada medio se obtuvieron los siguientes ajustes para muestras patrón y en vino tinto respectivamente (Figura 8.21):

$$i_c (\mu A) = 0.400 \cdot x \log [\text{Sacch}] + 0.537 \quad (r = 0.996) \quad \text{Ecuación 7}$$

$$i_c \text{ (nA)} = 0.397 \cdot x \log [\text{Sacch}] + 3.431 \quad (r = 0.991) \quad \text{Ecuación 8}$$

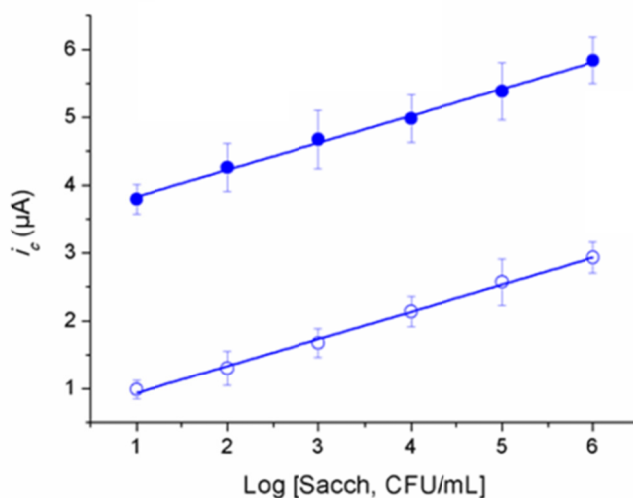


Figura 8.21 Curvas de calibrado del biosensor para levaduras totales en disoluciones patrón (círculos blancos) y en muestras de vino tinto comercial (círculos azules).

Nuevamente, el sensor desarrollado no mostró efecto matriz de la muestra estudiada, obteniéndose un límite de detección de 5 UFC/mL tanto en disoluciones patrón como en la muestra de vino tinto. Este valor es inferior al encontrado en bibliografía. Por otro lado, la sensibilidad del biosensor de levaduras totales fue superior al obtenido para la determinación de Brett, lo que confirma la elevada afinidad de la ConA hacia las manoproteínas de las levaduras [Chen et al., 2005; Heiskanen et al., 2008].

Se evaluó además la selectividad de los biosensores desarrollados hacia diferentes levaduras, pudiéndose comprobar la excelente selectividad del biosensor preparado con el anticuerpo de Brett (**Figure 8.22**), demostrándose la especificidad que aporta el anticuerpo. Por el contrario, y tal como se esperaba, las nanopartículas funcionalizadas con ConA muestra afinidad hacia todas las levaduras debido a que esta lectina reconoce las manoproteínas de la pared celular.

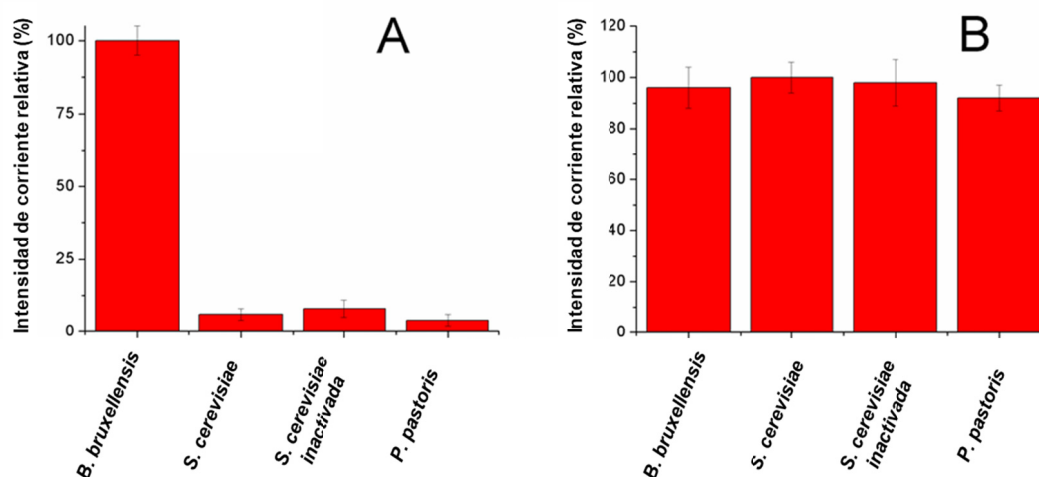


Figura 8.22 Respuesta electroquímica obtenida de los biosensores de Brett (A) y levaduras totales (B) frente a distintas levaduras a una concentración de 10^3 UFC/mL en vino tinto sin diluir.

Con el fin de determinar la afinidad del biosensor basado en NanoCaptors funcionalizados con ConA en la determinación de levaduras total, se preparó un calibrado usando una mezcla del 50% de Brett y el 50% de Sacch, obteniéndose el siguiente ajuste para 10 réplicas:

$$i_c (\mu A) = 0.382 \cdot x \log [\text{Yeast}] + 3.852 \quad (r = 0.994) \quad \text{Ecuación 9}$$

Este ajuste, muy similar al obtenido para solo Sacch demuestra que este biosensor no es capaz de discriminar entre estas levaduras debido a la afinidad específica de la ConA hacia las manoproteínas, lo que permite su empleo en la determinación de levaduras totales, sin ser capaz de diferenciar entre diferentes cepas.

Los biosensores preparados a partir de estos NanoCaptors funcionalizados con distintos biorreceptores mostraron una reproducibilidad hacia una concentración de 10^3 UFC/mL de levadura Brett y Sacch en vino tinto del 9.6 % RSD y 11.5 % RSD, respectivamente.

Finalmente, se evaluó la estabilidad de los NanoCaptors funcionalizados, los cuales mantuvieron su capacidad de captura basada en afinidad tras 3 meses almacenados a 4 °C. Esta buena estabilidad puede deberse a la buena biocompatibilidad de la cubierta de SiO_2 [Yang et al., 2016].

Los resultados obtenidos con estos cuatro sensores para el análisis de levaduras en muestras de vino muestran como estos biosensores desechables pueden

ser una valiosa propuesta para la preparación de dispositivos electroquímicos sensibles y seguros para el análisis microbiano en alimentos. Se ha demostrado además que el uso nanomateriales como derivados de óxido de grafeno reducido o NanoCaptors resultan de gran utilidad en el diseño de estos biosensores, facilitando la incorporación del biorreceptor de forma sencilla y eficaz, permitiendo incluso mejorar la respuesta analítica de estos dispositivos.

El uso de estos derivados de grafeno o de los NanoCaptors funcionalizados con los biorreceptores seleccionados han permitido obtener sensores electroquímicos con unas buenas características analíticas, como un amplio intervalo lineal, bajos límites de detección, alta selectividad, buena estabilidad de almacenamiento, incluso durante largos periodos en el caso de los NanoCaptors funcionalizados, y permitiendo un rápido análisis.

Por su parte, se ha podido comprobar la utilidad de estas nanopartículas magnéticas con estructura $\text{Fe}_4\text{O}_3@\text{SiO}_2$, las cuales se pueden funcionalizar con biomoléculas específicas, obteniendo así herramientas adecuadas para la determinación en este caso de levaduras en vino, mediante un manejo sencillo, que permite la separación y purificación magnética de las levaduras seleccionadas. Además, se ha comprobado como mediante un cambio en el biorreceptor, estas nanopartículas se pueden emplear para determinar distintos analitos, lo que resulta en una amplia variedad de aplicaciones.

9.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos y descritos en la memoria de esta Tesis Doctoral, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. La modificación covalente del óxido de grafeno con el polianión O-carboximetilcelulosa permite la construcción de arquitecturas polielectrostáticas tipo “capa-a-capa” sobre superficies electródicas funcionalizadas con este nanohíbrido, empleando derivados de dendrímero de poliamidoamina de cuarta generación y núcleo de etilenediamina como elementos complementarios.

2. Se construyó un biosensor enzimático para la detección amperométrica de catecol mediante inmovilización covalente de la enzima tirosinasa sobre electrodos modificados con el nanohíbrido de GO-CMC y una capa de PAMAM G-4. El biosensor presentó excelentes propiedades analíticas y de estabilidad.

3. Se preparó un nanohíbrido basado en nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 recubiertas con polidopamina, funcionalizadas con PAMAM G-4 y decoradas con nanopartículas de platino. Este nanohíbrido fue empleado en el diseño de un biosensor de xantina oxidasa con arquitectura capa-a-capa, utilizando electrodos modificados con el derivado GO-CMC. Este biosensor fue empleado para la detección de xantina con alta reproducibilidad y sensibilidad, así como bajos tiempos de respuesta y límite de detección.

4. Se comprobó la efectividad de nuevos derivados de óxido de grafeno y óxido de grafeno/nanopartículas de oro, funcionalizados con residuos de ácido propiónico, como elementos de transducción para la construcción de inmunosensores electroquímicos para la detección altamente sensible y específica de *S. cerevisiae* y *B. bruxellensis*.

5. Se funcionalizaron nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ con dos biorreceptores diferentes, Con A y anti-Brett, las cuales fueron empleadas como elementos de captura para el diseño de dos biosensores amperométricos para determinar el contenido de levaduras totales y *B. bruxellensis*, respectivamente. Ambos biosensores presentaron una buena reproducibilidad, alta sensibilidad, bajos límites de detección, así como un rápido tiempo de respuesta.

6. Todas las plataformas electroanalíticas fueron satisfactoriamente evaluadas en muestras reales, demostrándose su potencial utilidad como dispositivos para el análisis químico y microbiológico de alimentos.

10.

Referencias

A

- [Abbas et al., 2018] O. Abbas, M. Zadavec, V. Baeten, T. Mikuš, T. Lešić, A. Vulić, J. Pleadin. Analytical methods used for the authentication of food of animal origin. *Food Chem.* 246 (2018) 6-17.
- [Abdulbari & Basheer, 2017] H. A. Abdulbari, E. A. Basheer. Electrochemical biosensors: electrode development, materials, design, and fabrication. *ChemBioEng Rev.* 4 (2017) 92-105.
- [Adhikari et al., 2015] B. Adhikari, M. Govindhan, A. Chen. Sensitive detection of acetaminophen with graphene-based electrochemical sensor. *Electrochim. Acta* 162 (2015) 198-204.
- [Aksoy et al., 2019] G. K. Aksoy, M. Koyun, K. Ichida, E. Comak, S. Akman. Renal stone and chronic kidney failure associated with hypouricemia: Answers. *Pediatr. Nephrol.* 34 (2019) 1225-1227.
- [Akkaya et al., 2018] B. Akkaya, B. Çakiroglu, M. Özacar. Tannic acid-reduced graphene oxide deposited with Pt nanoparticles for switchable bioelectronics and biosensors based on direct electrochemistry. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 6 (2018) 3805-3814.
- [Alonso-Cristobal et al., 2015] P. Alonso-Cristobal, P. Vilela, A. El-Sagheer, E. Lopez-Cabarcos, T. Brown, O. L. Muskens, A. G. Kanaras. Highly sensitive DNA sensor based on upconversion nanoparticles and graphene oxide. *ACS Appl. Mater. Inter.* 7 (2015) 12422-12429.
- [Alu'datt et al., 2017] M. H. Alu'datt, T. Rababah, M. N. Alhamad, M. A. Al-Mahasneh, A. Almajwal, S. Gammoh, I. Alli. A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. *Food Chem.* 218 (2017) 99-106.
- [Antiochia & Gorton, 2014] R. Antiochia, L. Gorton. A new osmium-polymer modified screen-printed graphene electrode for fructose detection. *Sens. Actuator B-Chem.* 195 (2014) 287-293.
- [Apetrei et al., 2019] R. Apetrei, G. Cârâcb, G. Bahrma, P. Camurluc. Utilization of enzyme extract self-encapsulated within polypyrrole in sensitive detection of catechol. *Enzyme. Microb. Technol.* 128 (2019) 34-39.
- [Araque et al., 2013] E. Araque, R. Villalonga, M. Gamella, P. Martínez-Ruiz, J. Reviejo, J. M. Pingarrón. Crumpled reduced graphene oxide-polyamidoamine dendrimer hybrid nanoparticles for the preparation of an electrochemical biosensor. *J. Mater. Chem. B* 1 (2013) 2289-2296.
- [Araque et al., 2014a] E. Araque, R. Villalonga, M. Gamella, P. Martínez-Ruiz, A. Sánchez, V. García-Baonza, J. M. Pingarrón. Water soluble reduced graphene oxide-carboxymethylcellulose hybrid nanomaterial for electrochemical biosensor design. *ChemPlusChem* 79 (2014) 1334-1341
- [Araque et al., 2014b] E. Araque, C. B. Arenas, M. Gamella, J. Reviejo, R. Villalonga, J. M. Pingarrón. Graphene-polyamidoamine dendrimer-Pt nanoparticles hybrid nanomaterial for the preparation of mediatorless enzyme biosensor. *J. Electroanal. Chem.* 717-718 (2014) 96-102.

[Arduini et al., 2016] F. Arduini, L. Micheli, D. Moscone, G. Palleschi, S. Piermarini, F. Ricci, G. Volpe. Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis. *Trends Anal. Chem.* 79 (2016) 114-126.

[Arenas et al., 2016] C. B. Arenas, E. Sanchez-Tirado, I. Ojeda, C. A. Gomez-Suarez, A. Gonzalez-Cortés, R. Villalonga, J. M. Pingarron. An electrochemical immunosensor for adiponectin using reduced graphene oxide-carboxymethylcellulose hybrid as electrode scaffold. *Sens. Actuator B-Chem.* 223 (2016) 89–94.

[Arvand et al., 2018] M. Arvand, M. Sanayeei, S. Hemmati, Label-free electrochemical DNA biosensor for guanine and adenine by ds-DNA/Poly(L-Cysteine)/Fe₃O₄ nanoparticles-graphene oxide nanocomposite modified electrode. *Biosens. Bioelectron.* 102 (2018) 70–79.

[Avan et al., 2015] A. A. Avan, S. Aydar, H. Filik. Voltammetric sensing of bilirubin based on Nafion/electrochemically reduced graphene oxide composite modified glassy carbon electrode. *Curr. Anal. Chem.* 11 (2015) 96-103.

B

[Balasundram et al., 2006] N. Balasundram, K. Sundram, S. Samman, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99 (2006) 191-203.

[Bahadır & Sezgentürk, 2016] E. B. Bahadır, M. K. Sezgentürk. Poly (amidoamine) (PAMAM): An emerging material for electrochemical bio(sensing) applications. *Talanta* 148 (2016) 427-438.

[Barreto et al., 2009] G. Barreto, D. Madureira, F. Capani, L. Aon-Bertolino, E. Saraceno, L. D. Alvarez-Giraldez. The role of catechols and free radicals in benzene toxicity: an oxidative DNA damage pathway. *Environ. Mol. Mutagen.* 50 (2009) 771-780.

[Baş et al., 2011] S. Z. Baş, H. Gülce, S. Yıldız. Amperometric xanthine biosensors based on electrodeposition of platinum on polyvinylferrocenium coated Pt electrode. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 72 (2011) 282-288.

[Baş et al., 2014] S. Z. Baş, H. Gülce, S. Yildiz. Hypoxanthine biosensor based on immobilization of xanthine oxidase on modified Pt electrode and its application for fish meat. *Int. J. Polym. Mater.* 63 (2014) 476-485.

[Becker et al., 2019] M. M. Becker, E. B. Ribeiro, P. R. Brasilde, O. M. Jean, L. M. Gilvanda Silva, N. G. Catanante. Development of a highly sensitive xanthine oxidase-based biosensor for the determination of antioxidant capacity in Amazonian fruit samples. *Talanta* 204 (2019) 626-632.

[Bianco et al., 2013] A. Bianco, H. M. Cheng, T. Enoki, Y. Gogotsi, R. H. Hurt, T. Kyotani, M. Monthieux, C. R. Park, J. M. D. Tascon, J. Zhang. All in the graphene family-A recommended nomenclature for two-dimensional carbon materials. *Carbon* 65 (2013) 1-6.

- [Blomqvist et al., 2010] J. Blomqvist, T. Eberhard, J. Schnürer, V. Passoth, Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. *Appl. Microbiol. Biot* 87 (2010) 1487-1497.
- [Bollella et al., 2017] P. Bollella, G. Fusco, C. Tortolini, G. Sanzò, G. Favero, L. Gorton, R. Antiochia Beyond graphene: electrochemical sensors and biosensors for biomarkers detection *Biosens. Bioelectron.* 89 (2017) 152-166.
- [Borisova et al., 2015] B. Borisova, J. Ramos, P. Díez, A. Sanchez, C. Parrado, E. Araque, R. Villalonga, J. M. Pingarrón. A layer-by-layer biosensing architecture based on polyamidoamine dendrimer and carboxymethylcellulose-modified graphene oxide. *Electroanal.* 27 (2015) 2131-2138.
- [Borisova et al., 2016] B. Borisova, A. Sánchez, S. Jiménez-Falcao, M. Martín, P. Salazar, C. Parrado, J. M. Pingarrón, R. Villalonga. Reduced graphene oxide-carboxymethylcellulose layered with platinum nanoparticles/PAMAM dendrimer/magnetic nanoparticles hybrids. Application to the preparation of enzyme electrochemical biosensors. *Sens. Actuator B-Chem.* 232 (2016) 84-90.
- [Borisova et al., 2017] B. Borisova, M. L. Villalonga, M. Arévalo-Villena, A. Boujakhrou, A. Sánchez, C. Parrado, J. M. Pingarrón, A. Briones-Pérez, R. Villalonga. Disposable electrochemical immunosensor for *Brettanomyces Bruxellensis* based on nanogold-reduced graphene oxide hybrid nanomaterial. *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 5667-5674.
- [Borisova et al., 2018] B. Borisova, A. Sánchez, P. E. D. Soto Rodriguez, A. Boujakhrou, M. Arévalo-Villena, J. M. Pingarrón, A. Briones-Pérez, C. Parrado, R. Villalonga. Disposable amperometric immunosensor for *Saccharomyces cerevisiae* based on carboxylated graphene oxide-modified electrodes. *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 7901–7907.
- [Boujakhrou et al., 2015] A. Boujakhrou, A. Sánchez, P. Díez, S. Jiménez-Falcao, P. Martínez-Ruiz, M. Peña-Álvarez, R. Villalonga. Decorating graphene oxide/nanogold with dextran-based polymer brushes for the construction of ultrasensitive electrochemical enzyme biosensors. *J. Mater. Chem. B* 3 (2015) 3518-3524.
- [Buzea & Pacheco, 2017] C. Buzea, I. Pacheco. Nanomaterials and their classification. Book chapter in *EMR/ESR/EPR Spectroscopy for Characterization of Nanomaterials* (2017) 3-45 Springer, New Delhi.

C

- [Campuzano et al., 2017] S. Campuzano, P. Yañez-Sedeño, J. M. Pingarrón. Electrochemical bioaffinity sensors for salivary biomarkers detection. *Trends Anal. Chem.* 86 (2017) 14-24.
- [Çakıroglu & Ozacar, 2017] B. Çakıroglu, M. Ozacar. Tannic acid modified electrochemical biosensor for glucose sensing based on direct electrochemistry. *Electroanal.* 29 (2017) 2719-2726.

- [Castro-Ibáñez et al., 2017] I. Castro-Ibáñez, M. I. Gil, A. Allende. Ready-to-eat vegetables: current problems and potential solutions to reduce microbial risk in the production chain. *LWT* 85 (2017) 284-292.
- [Cecchini et al., 2012] F. Cecchini, M. Manzano, Y. Mandabi, E. Perelman, R. S. Marks. Chemiluminescent DNA optical fibre sensor for *Brettanomyces bruxellensis* detection. *J. Biotechnol.* 157 (2012) 25-30.
- [Çevik et al., 2016] E. Çevik, Ö. Bahar, M. Şenel, M. F. Abasıyanık. Construction of novel electrochemical immunosensor for detection of prostate specific antigen using ferrocene-PAMAM dendrimers. *Biosens. Bioelectron.* 86 (2016) 1074-1079.
- [Cincotto et al., 2015] F. H. Cincotto, T. C. Canevari, S. A. Machado, A. Sánchez, M. A. Barrio, R. Villalonga, J. M. Pingarrón. Reduced graphene oxide-Sb₂O₅ hybrid nanomaterial for the design of a laccase-based amperometric biosensor for estriol. *Electrochim. Acta* 174 (2015) 332-339.
- [Chairam et al., 2011] S. Chairam, W. Sriraksa, M. Amatatongchai, E. Somsook. Electrocatalytic oxidation of ascorbic acid using a poly(aniline-co-m-ferrocenylaniline) modified glassy carbon electrode. *Sensors* 11 (2011) 10166-10179.
- [Chalker-Scott & Fuchigami, 2018] L. Chalker-Scott, L. H. Fuchigami. The role of phenolic compounds in plant stress responses. Book chapter in *Low temperature stress physiology in crops* (2018) 67-80 CRC Press.
- [Chen et al., 2005] H. Chen, C. K. Heng, P. D. Puiu, X. D. Zhou, A. C. Lee, T. M. Lim, S. N. Tan. Detection of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on self-assembled monolayer (SAM) of alkanethiolate using electrochemical impedance spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* 554 (2005) 52-59.
- [Chen et al., 2012] D. Chen, H. Feng, J. Li. Graphene oxide: preparation, functionalization, and electrochemical applications. *Chem. Rev.* 112 (2012) 6027-6053.
- [Cocolin et al., 2004] L. Cocolin, K. Rantsiou, L. Iacumin, R. Zironi, G. Comi. Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in spoiled wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 1347-1355.
- [Compton & Nguyen, 2010] O. C. Compton, S. T. Nguyen. Graphene oxide, highly reduced graphene oxide, and graphene: versatile building blocks for carbon-based materials. *Small* 6 (2010) 711-723.
- [Croft et al., 2018] K. D. Croft, Y. Yamashita, H. O'Donoghue, D. Shirasaya, N. C. Ward, H. Ashida. Screening plant derived dietary phenolic compounds for bioactivity related to cardiovascular disease. *Fitoterapia* 126 (2018) 22-28.
- [Crulhas et al., 2019] B. P. Crulhas, C. R. Basso, J. P. R. L. L. Parra, G. R. Castro, V. A. Pedrosa. Reduced graphene oxide decorated with AuNPs as a new aptamer-based biosensor for the detection of androgen receptor from prostate cells. *J. Sens.* (2019) Article ID: 5805609.

[Cui et al., 2019] M. Cui, Z. Shao, D. Lu, Y. Wang. Eco-friendly electrochemical biosensor based on sodium carboxymethyl cellulose/reduced graphene oxide composite. *Macromol. Res.* 27 (2019) 327-333.

D

[Dalkiran et al., 2017] B. Dalkiran, P. E. Erden, E. Kiliç. Amperometric biosensors based on carboxylated multiwalled carbon nanotubes-metal oxide nanoparticles-7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane composite for the determination of xanthine. *Talanta* 167 (2017) 286-295.

[De Barros Pita et al., 2011] W. de Barros Pita, F. C. B. Leite, A. T. de Souza Liberal, D. A. Simões, M. A. de Moraes. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 100 (2011) 99-107.

[Da Silva Neves et al., 2018] M. M. P. Da Silva Neves, M. B. González-García, D. Hernandez-Santos, P. Fanjul-Bolado. Future trends in the market for electrochemical biosensing. *Curr. Opin. Electrochem.* 10 (2018) 107-111.

[Decker et al., 2006] H. Decker, T. Schweikardt, F. Tuczek. The first crystal structure of tyrosinase: all questions answered? *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (2006) 4546-4550.

[Dey & Raj, 2013] R. S. Dey, C. R. Raj. A hybrid functional nanoscaffold based on reduced graphene oxide-ZnO for the development of an amperometric biosensing platform. *RSC Adv.* 3 (2013) 25858-25864.

[Delaherche et al., 2004] A. Delaherche, O. Claisse, A. Lonvaud-Funel. Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and 'ropy' *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.* 97 (2004) 910-915.

[Devi et al., 2011] R. Devi, S. Yadav, C. S. Pundir. Electrochemical detection of xanthine in fish meat by xanthine oxidase immobilized on carboxylated multiwalled carbon nanotubes/polyaniline composite film. *Biochem. Eng. J.* 58 (2011) 148-153.

[Devi et al., 2012] R. Devi, S. Yadav, C. S. Pundir. Amperometric determination of xanthine in fish meat by zinc oxide nanoparticle/chitosan/multiwalled carbon nanotube/polyaniline composite film bound xanthine oxidase. *Analyst* 137 (2012) 754-759.

[Devi et al., 2013] R. Devi, B. Batra, S. Lata, S. Yadav, C. S. Pundir, A method for determination of xanthine in meat by amperometric biosensor based on silver nanoparticles/cysteine modified Au electrode. *Process Biochem.* 48 (2013) 242-249.

[Dervisevic et al., 2017a] E. Dervisevic, M. Dervisevic, J. N. Nyangwebah, M. Şenel. Development of novel amperometric urea biosensor based on Fc-PAMAM and MWCNT bio-nanocomposite film. *Sens. Actuator B-Chem.* 246 (2017) 920-926.

[Dervisevic et al., 2017b] M. Dervisevic, E. Dervisevic, E. Cevik, M. Senel. Novel electrochemical xanthine biosensor based on chitosane polypyrrole-gold nanoparticles hybrid bio-nanocomposite platform. *J. Food Drug Anal.* 25 (2017) 510–519.

[Dervisevic et al., 2015] M. Dervisevic, E. Custiuc, E. Çevik, M. Senel. Construction of novel xanthine biosensor by using polymeric mediator/MWCNT nanocomposite layer for fish freshness detection. *Food Chem.* 181 (2015) 277–283

[Dervisevic et al., 2016] M. Dervisevic, E. Dervisevic, H. Azak, E. Cevik, M. Senel, H. B. Yildizd. Novel amperometric xanthine biosensor based on xanthine oxidase immobilized on electrochemically polymerized 10-[4H-dithieno(3,2-b: 2,3 -d)pyrrole-4-yl]decane-1-amine film. *Sens. Actuator B-Chem.* 225 (2016) 181-187.

[Dolez, 2015] P. I. Dolez. Nanomaterials definitions, classifications, and applications. *Nanoengineering* (2015) 3-40

[Dreyer et al., 2010] D. R. Dreyer, S. Park, C. W. Bielawski, R. S. Ruoff. The chemistry of graphene oxide. *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 228-240.

E

[Eletxigerra et al., 2016] U. Eletxigerra, J. Martínez-Perdiguero, S. Merino, R., Barderas, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, R. Villalonga, J. M. Pingarrón, S. Campuzano. Electrochemical magnetoimmunosensor for progesterone receptor determination. application to the simultaneous detection of estrogen and progesterone breast-cancer related receptors in raw cell lysates. *Electroanal.* 28 (2016) 1787-94.

[Enroth et al., 2000] C. Enroth, B. T. Eger, K. Okamoto, T. Nishino, T. Nishino, E. F. Pai. Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *PNAS* 97 (2000) 10723-10728.

[Escot et al., 2001] S. Escot, M. Feuillat, L. Dulau, C. Charpentier. Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Aust. J. Grape Wine Res.* 7 (2001) 153-159.

[Espín et al., 2000] J. C. Espín, R. Varón, L. G. Fenoll, M. A. Gilabert, P. A. García-Ruiz, J. Tudela, F. García-Cánovas. Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 1270-1279.

F

[Fan et al., 2007] Q. Fan, D. Shan, H. Xue, Y. He, S. Cosnier. Amperometric phenol biosensor based on laponite clay–chitosan nanocomposite matrix. *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 816-821.

- [Fang et al., 2015] Y. Fang, D. Zhang, Y. Guo, Y. Guo, Q. Chen. Simple one-pot preparation of chitosan-reduced graphene oxide–Au nanoparticles hybrids for glucose sensing. *Sens. Actuator B-Chem.* 221 (2015) 265-272.
- [Fartas et al., 2017] F. M. Fartas, J. Abdullah, N. A. Yusof, Y. Sulaiman, M. I. Saiman. Biosensor based on tyrosinase immobilized on graphene-decorated gold nanoparticle/chitosan for phenolic detection in aqueous. *Sensors* 17 (2017) 1132.
- [Fathy et al., 2018] S. A. Fathy, F. F. A. Hamid, A. E. Nemr, A. El-Maghraby, E. Serag. Tyrosinase biosensor based on multiwall carbon nanotubes-titanium oxide nanocomposite for catechol determination. *Desalin. Water Treat.* 130 (2018) 98-108
- [Feng, 1996] P. Feng. Emergence of rapid methods for identifying microbial pathogens in foods. *J. AOAC Int.* 79 (1996) 809-812.
- [Feng et al., 2015] X. Feng, H. Cheng, Y. Pan, H. Zheng, Development of glucose biosensors based on nanostructured graphene conducting polyaniline composite. *Biosens. Bioelectron.* 70 (2015) 411-417.
- [Fennema et al., 2017] O. R. Fennema, S. Damodaran, K. L. Parkin. Introduction to food chemistry. *Chapter 1 Fennema's Food Chemistry. CRC Press* (2017) 1-16.
- [Friák et al., 2007] M. Friák, A. Schindlmayr, M. Scheffler. Ab initio study of the half-metal to metal transition in strained magnetite. *New J. Phys.* 9 (2007) 5.
- [Fritea et al., 2015] L. Fritea, A. Goff, J. L. Putaux, M. Tertis, C. Cristea, R. Sandulescu, S. Cosnier. Design of a reduced-graphene-oxide composite electrode from an electropolymerizable graphene aqueous dispersion using a cyclodextrin-pyrrole monomer. Application to dopamine biosensing. *Electrochim. Acta* 178 (2015) 108-112.
- [Fu et al., 2015] J. Fu, Z. Pang, J. Yan, F. Huang, Y. Ca, Q. Wei. Fabrication of polyaniline/carboxymethyl cellulose/cellulose nanofibrous mats and their biosensing application. *Appl. Surf. Sci.* 349 (2015) 35–42.

G

- [Galafassi et al., 2013] S. Galafassi, C. Capusoni, M. Moktaduzzaman, C. Compagno. Utilization of nitrate abolishes the “Custers effect” in *Dekkera bruxellensis* and determines a different pattern of fermentation products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40 (2013) 297-303.
- [Geniès et al., 1998] L. Geniès, R. Faure, R. Durand, Electrochemical reduction of oxygen on platinum nanoparticles in alkaline media. *Electrochim. Acta* 44 (1998) 1317-1327.
- [Giannetto et al., 2014] M. Giannetto, E. Umiltà, M. Careri. New competitive dendrimer-based and highly selective immunosensor for determination of atrazine in environmental, feed and food samples: the importance of antibody selectivity for discrimination among related triazinic metabolites. *Anal. Chim. Acta* 806 (2014) 197-203.

- [Guo et al., 2010] S. Guo, D. Wen, Y. Zhai, S. Dong, E. Wang. Platinum nanoparticle ensemble-on graphene hybrid nanosheet: One-pot, rapid synthesis, and used as new electrode material for electrochemical sensing. *ACS Nano* 47 (2010) 3959-3968.
- [Georgakilas et al., 2016] V. Georgakilas, J. N. Tiwari, K. C. Kemp, J. A. Perman, A. B. Bourlinos, K. S. Kim, R. Zboril. Noncovalent functionalization of graphene and graphene oxide for energy materials, biosensing, catalytic, and biomedical applications. *Chem. Rev.* 116 (2016) 5464-5519.
- [Gómez-Navarro et al., 2010] C. Gómez-Navarro, J. C. Meyer, R. S. Sundaram, A. Chuvilin, S. Kurasch, M. Burghard, U. Kaiser. Atomic structure of reduced graphene oxide. *Nano Lett.* 10 (2010) 1144-1148.
- [Gómez-Pastora et al., 2017] J. Gómez-Pastora, S. Dominguez, E. Bringas, M. J. Rivero, I. Ortiz, D. D. Dionysiou. Review and perspectives on the use of magnetic nanophotocatalysts (MNPCs) in water treatment. *Chem. Eng. J.* 310 (2017) 407-427.
- [Govindhan et al., 2015] M. Govindhan, M. Amiri, A. Chen. Au nanoparticle/graphene nanocomposite as a platform for the sensitive detection of NADH in human urine. *Biosens. Bioelectron.* 66 (2015) 474-480.
- [Grieshaber et al., 2008] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. E. Vörös. Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. *Sensors* 8 (2008) 1400-1458.
- [Guerrero-Contreras & Caballero-Briones, 2015] J. Guerrero-Contreras, F. Caballero-Briones. Graphene oxide powders with different oxidation degree, prepared by synthesis variations of the Hummers method. *Mater. Chem. Phys.* 153 (2015) 209-220.
- [Guo & Wang, 2007] S. Guo, E. Wang. Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. *Anal. Chim. Acta* 598 (2007) 181-192.
- [Guzzon et al., 2018] R. Guzzon, R. Larcher, R. Guarcello, N. Francesca, L. Settanni, G. Moschetti. Spoilage potential of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Italian wines. *Food Res. Int.* 105 (2018) 668-677.

H

- [Han et al., 2000] S. Han, X. Li, G. Guo, Y. Sun, Z. Yuan. Voltammetric measurement of microorganism populations, *Anal. Chim. Acta* 405 (2000) 115-121
- [Harrison, 2004] R. Harrison. Physiological roles of xanthine oxidoreductase. *Drug Metab. Rev.* 36 (2004) 363-375.
- [Hammond et al., 2016] J. L. Hammond, N. Formisano, P. Estrela, S. Carrara, J. Tkac. Electrochemical biosensors and nanobiosensors. *Essays Biochem.* 60 (2016) 69-80.

- [Hasanzadeh et al.,2015] M. Hasanzadeh, N. Shadjou, M. de la Guardia. Iron and iron-oxide magnetic nanoparticles as signal-amplification elements in electrochemical biosensing. *Trends Anal. Chem.* 72 (2015) 1-9.
- [Hasanzadeh et al., 2016] M. Hasanzadeh, N. Shadjou, A. Mokhtarzadeh, M. Ramezani. Two dimension (2-D) graphene-based nanomaterials as signal amplification elements in electrochemical microfluidic immune-devices: recent advances. *Mater. Sci. Eng. C* 68 (2016) 482-493.
- [Hasegawa et al., 2006] T. Hasegawa, M. Matsuzaki-Kobayashi, A. Takeda, N. Sugeno, A. Kikuchi, K. Furukawa, Y. Itoyama. α -Synuclein facilitates the toxicity of oxidized catechol metabolites: Implications for selective neurodegeneration in Parkinson's disease. *FEBS Lett.* 580 (2006) 2147-2152.
- [Haun et al., 2010] J. B. Haun, T. J. Yoon, H. Lee, R. Weissleder. Magnetic nanoparticle biosensors. *WIREs: Nanomed. Nanobiotechnol.* 2 (2010) 291-304.
- [Heinze & Koschella, 2005] T. Heinze, A. Koschella. Carboxymethyl ethers of cellulose and starch-a review. *Macromol. Symp.* 223 (2005) 13-40.
- [Hedayatnasab et al., 2017] Z. Hedayatnasab, F. Abnisa, W.M.A.W. Daud. Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application. *Mater. Des.* 123 (2017) 174-196.
- [Heiskanen et al., 2008] A. R. Heiskanen, C. F. Spégel, N. Kostesha, T. Ruzgas, J. Emnéus. Monitoring of *Saccharomyces cerevisiae* cell proliferation on thiol-modified planar gold microelectrodes using impedance spectroscopy. *Langmuir* 24 (2008) 9066-9073.
- [Hoekstra et al., 2018] R. Hoekstra, P. Blondeau, F. J. Andrade. Distributed electrochemical sensors: recent advances and barriers to market adoption. *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 4077-4089.
- [Honeychurch & Piano, 2018] K. Honeychurch, M. Piano. Electrochemical (bio)sensors for environmental and food analyses. *Biosensors* 8 (2018) 57.
- [Hossain & Park, 2014] M. F. Hossain, J. Y. Park. Amperometric glucose biosensor based on Pt-Pd nanoparticles supported by reduced graphene oxide and integrated with glucose oxidase. *Electroanal.* 26 (2014) 940-951.
- [Hrapovich et al., 2004] S. Hrapovich, Y. Liu, K. B. Male, J. H. T. Luong. Electrochemical biosensing platforms using platinum nanoparticles and carbon nanotubes. *Anal. Chem.* 76 (2004) 1083-1088.
- [Huang et al., 2009] W. Y. Huang, Y. Z. Cai, Y. Zhang. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr. Cancer* 62 (2009) 1-20.

[Huang et al., 2014] K. J. Huang, Y. J. Liu, H. B. Wang, Y. Y. Wang. A sensitive electrochemical DNA biosensor based on silver nanoparticles-polydopamine@graphene composite. *Electrochim. Acta* 118 (2014) 130-137.

[Huang et al., 2015] J. Huang, J. Tian, Y. Zhao, S. Zhao. Ag/Au nanoparticles coated graphene electrochemical sensor for ultrasensitive analysis of carcinoembryonic antigen in clinical immunoassay. *Sens. Actuator B-Chem.* 206 (2015) 570-576.

[Ishigami et al., 2007] M. Ishigami, J. H. Chen, W. G. Cullen, M. S. Fuhrer, E. D. Williams. Atomic structure of graphene on SiO₂. *Nano Lett.* 7 (2007) 1643-1648.

[Ismaya et al., 2011] W. T. Ismaya, H. J. Rozeboom, A. Weijn, J. J. Mes, F. Fuseti, H. J. Wichers, B. W. Dijkstra. Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry* 50 (2011) 5477-5486.

J

[Jang et al., 2015] H. Jang, S. Kim, H. Chang, J. Choi. 3D label-free prostate specific antigen (PSA) immunosensor based on graphene-gold composites. *Biosens. Bioelectron.* 63 (2015) 546-551.

[Jennings, 1981] A. C. Jennings The determination of dihydroxy phenolic compounds in extracts of plant tissues. *Anal. Biochem.* 118 (1981) 396-398.

[Jia et al., 2014] X. Jia, Z. Liu, N. Liu and Z. Ma. A label-free immunosensor based on graphene nanocomposites for simultaneous multiplexed electrochemical determination of tumor markers. *Biosens. Bioelectron.* 53 (2014) 160-166.

[Johnson et al., 2019] J. Johnson, D. Atkin, K. Lee, M. Sell, S. Chandra. Determining meat freshness using electrochemistry: are we ready for the fast and furious? *Meat Sci.* 150 (2019) 40-46.

[Jolly et al., 2014] N. P. Jolly, C. Varela, I. S. Pretorius. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.* 14 (2014) 215-237.

[Jumpathong et al., 2016] W. Jumpathong, J. Jakmunee, K. Ounnunkad. A Sensitive and disposable graphene oxide electrochemical immunosensor for label-free detection of human immunoglobulin G. *Anal. Sci.* 32 (2016) 323-328

[Justino et al., 2017] C. I. Justino, A. R. Gomes, A. C. Freitas, A. C. Duarte, T. A. Rocha-Santos. Graphene based sensors and biosensors. *Trends Anal. Chem.* 91 (2017) 53-66.

K

[Kaçari et al., 2016] C. Kaçari, F. Öztürk, P. E. Erden, E. Kiliç. Magnetite nanoparticles and Prussian blue modified amperometric biosensor for lactic acid determination. *Nisan* 42 (2016) 17-29.

- [Kavosi et al., 2014] B. Kavosi, A. Salimi, R. Hallaj, K. Amani. A highly sensitive prostate-specific antigen immunosensor based on gold nanoparticles/PAMAM dendrimer loaded on MWCNTs/chitosan/ionic liquid nanocomposite. *Biosens. Bioelectron.* 52 (2014) 22–28.
- [Karkan et al., 2017] S. F. Karkan, M. Mohammadhosseini, Y. Panahi, M. Milani, N. Zarghami, A. Akbarzadeh, S. Davaran. Magnetic nanoparticles in cancer diagnosis and treatment: a review. *Artif. Cell Nanomed. B* 45 (2017) 1-5.
- [Khoddami et al., 2013] A. Khoddami, M. Wilkes, T. Roberts. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* 18 (2013) 2328-2375.
- [Kilcast & Subramaniam, 2011] D. Kilcast, P. Subramaniam. Food and beverage stability and shelf life. (2011) Woodhead Publishing.
- [Kim et al., 2010] H. Kim, A. A. Abdala, C. W. Macosko. Graphene/polymer nanocomposites. *Macromolecules* 43 (2010) 6515-6530.
- [Krishnan et al., 2019] S. K. Krishnan, E. Singh, P. Singh, M. Meyyappan, H. S. Nalwa. A review on graphene-based nanocomposites for electrochemical and fluorescent biosensors. *RSC Adv.* 9 (2019) 8778-8881.
- [Kuila et al., 2011] T. Kuila, S. Bose, P. Khanra, A. K. Mishra, N. H. Kim, J. H Lee. Recent advances in graphene-based biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 4637-4648.
- [Kumarasamy et al., 2018] J. Kumarasamy, M. B. Camarada, D. Venkatraman, H. Ju, R. S. Dey, Y. Wen. One-step coelectrodeposition-assisted layer-by-layer assembly of gold nanoparticles and reduced graphene oxide and its self-healing three-dimensional nanohybrid for an ultrasensitive DNA sensor. *Nanoscale* 10 (2018) 1196-1206.
- [Kurbanoglu et al., 2017] S. Kurbanoglu, L. Rivas, S. A. Ozkan, A. Merkoçi. Electrochemically reduced graphene and iridium oxide nanoparticles for inhibition-based angiotensin-converting enzyme inhibitor detection. *Biosens. Bioelectron.* 88 (2017) 122-129.
- [Kurbanoglu & Ozkan] S. Kurbanoglu, S. A. Ozkan Tyrosinase Immobilization in multi walled carbon nanotube and gold nanowires matrice for catechol detection. *Proceedings* 1 (2017) 700.

L

- [Labieniec-Watala & Watala, 2015] M. Labieniec-Watala, C. Watala. PAMAM dendrimers: destined for success or doomed to fail? Plain and modified PAMAM dendrimers in the context of biomedical applications. *J. Pharm. Sci.* 104 (2015) 2-14.
- [Lehotay, 2018] S. J. Lehotay. Sensing techniques for food safety and quality control. *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 2271-2272.
- [Lei et al., 2014] W. Lei, W. Si, Y. Xu, Z. Gu, Q. Hao. Conducting polymer composites with graphene for use in chemical sensors and biosensors. *Microchim. Acta* 181 (2014) 707-722.

- [Li et al., 2015] L. Li, L. Zhang, J. Yu, S. Ge, X. Song. All-graphene composite materials for signal amplification toward ultrasensitive electrochemical immunosensing of tumor marker. *Biosens. Bioelectron.* 71 (2015) 108–114.
- [Li et al., 2016] X. Li, J. Wei, E. Aifantis, Y. Fan, Q. Feng, F. Z. Cui, F. Watari. Current investigations into magnetic nanoparticles for biomedical applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* 104 (2016) 1285-1296.
- [Lichtenberg et al., 2019] J. Y. Lichtenberg, Y. Ling, S. Kim. Non-Specific adsorption reduction methods in biosensing. *Sensors* 19 (2019) 2488.
- [Liu et al., 2015] X. Liu, R. Yan, J. Zhu, J. Zhang, X. Liu. Growing TiO₂ nanotubes on graphene nanoplatelets and applying the nanonocomposite as scaffold of electrochemical tyrosinase biosensor. *Sens. Actuator B-Chem.* 209 (2015) 328-35.
- [Lin et al., 2014] E. R. Lin, C. J. Chiu, Y. C. Tsai. One-step electrochemical synthesis of polypyrrole-graphene-glucose oxidase nanobiocomposite for glucose sensing. *J. Electrochem. Soc.* 161 (2014) B243-B247.
- [Lo & Shaw, 2018] Y. T. Lo, P. C. Shaw. DNA-based techniques for authentication of processed food and food supplements. *Food Chem.* 240 (2018) 767-774.
- [Loh et al., 2010] K. P. Loh, Q. Bao, P. K. Ang, J. Yang. The chemistry of graphene. *J. Mater. Chem. A* 20 (2010) 2277-2289.
- [Lopez et al., 2015] C. G. Lopez, S. E. Rogers, R. H. Colby, P. Graham, J. T. Cabral. Structure of sodium carboxymethyl cellulose aqueous solutions: A SANS and rheology study. *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.* 53 (2015) 492-501.
- [Lu et al., 2007] A. H. Lu, E. E. Salabas, F. Schüth. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Chemie Int. Ed.* 46 (2007) 1222-1244.

M

- [Madsen et al., 2016] M. G. Madsen, N. K. Edwards, M. A. Petersen, L. Mokwena, J. H. Swiegers, N. Arneborg. Influence of *Oenococcus oeni* and *Brettanomyces bruxellensis* on hydroxycinnamic acids and volatile phenols of aged wine. *Am. J. Enol. Viticajev.* 68 (2016) 23-29.
- [Maduraiveeran et al., 2018] G. Maduraiveeran, M. Sasidharan, V. Ganesan. Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications. *Biosens. Bioelectron.* 103 (2018) 113-129.
- [Mahmoudi-Badiki et al., 2017] T. Mahmoudi-Badiki, E. Alipour, H. Hamishehkar, S. M. Golabi. A performance evaluation of Fe₃O₄/Au and γ-Fe₂O₃/Au core/shell magnetic nanoparticles in an electrochemical DNA bioassay. *J. Electroanal. Chem.* 788 (2017) 210-216.

- [Manzano et al., 2016] M. Manzano, P. Vizzini, K. Jia, P. M. Adam, R. E. Ionescu. Development of localized surface plasmon resonance biosensors for the detection of *Brettanomyces bruxellensis* in wine. *Sens. Actuator B-Chem.* 223 (2016) 295–300.
- [Mao et al., 2010] S. Mao, G. Lu, K. Yu; Z. Bo, J. Chen. Specific protein detection using thermally reduced graphene oxide sheet decorated with gold nanoparticle-antibody conjugates. *J. Adv. Mater.* 22 (2010) 3521-3526.
- [Market Data Forecast, 2018] Market Data Forecast (2018) Food safety testing market by contaminant (microbial, GMOs, metal contaminants, pesticides and residues, toxins, food allergen, and others), by food type (meat & poultry, dairy product, processed food, beverages, fruits & vegetables, and others), by technology (traditional and rapid) and by region - global growth, trends, and forecast to 2024. Report ID. 699.
- [Martín et al., 2014] M. Martín, P. Salazar, R. Villalonga, S. Campuzano, J. M. Pingarrón, J. L. González-Mora. Preparation of core-shell Fe_3O_4 @poly(dopamine) magnetic nanoparticles for biosensor construction. *J. Mater. Chem. B* 2 (2014) 739-746.
- [Martorell et al., 2005] P. Martorell, A. Querol, M. T. Fernández-Espinar. Rapid identification and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* cells in wine by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 6823-6830.
- [Mazloun-Ardakani et al., 2015] M. Mazloun-Ardakani, L. Hosseinzadeh, Z. Taleat. Synthesis and electrocatalytic effect of Ag@Pt core-shell nanoparticles supported on reduced graphene oxide for sensitive and simple label-free electrochemical aptasensor. *Biosens. Bioelectron.* 74 (2015) 30-36.
- [Mehrabi et al., 2018] Z. Mehrabi, E. C. Ellis, N. Ramankutty. The challenge of feeding the world while conserving half the planet. *Nat. Sustain.* 1 (2018) 409.
- [Mercante et al., 2017] L. A. Mercante, M. H. M. Facure, R. C. Sanfelice, F. L. Migliorini, L. H. C. Mattoso and D. S. Correa. Onepot preparation of PEDOT:PSS-reduced graphene decorated with Au nanoparticles for enzymatic electrochemical sensing of H_2O_2 . *Appl. Surf. Sci.* 407 (2017) 162–170.
- [Meshram et al., 2018] B. D. Meshram, A. K. Agrawal, S. Adil, S. Ranvir, K. K. Sande. Biosensor and its application in food and dairy industry: a review. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 7 (2018) 3305-3324.
- [Meyer et al., 2007] J. C. Meyer, A. K. Geim, M. I. Katsnelson, K. S. Novoselov, T. J. Booth, S. Roth. The structure of suspended graphene sheets. *Nature* 446 (2007) 60-63.
- [Miodek et al., 2016] A. Miodek, N. Mejri-Omrani, R. Khoder, H. Korri-Youssoufi. Electrochemical functionalization of polypyrrole through amine oxidation of poly (amidoamine) dendrimers: Application to DNA biosensor. *Talanta* 154 (2016) 446-454.

[Mohammed et al., 2017] L. Mohammed, H. G. Gomaa, D. Ragab, J. Zhu. Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: a review. *Particuology* 30 (2017) 1-14.

[Myung et al., 2011] S. Myung, A. Solanki, C. Kim, J. Park, K. S. Kim, K. B. Lee. Graphene-encapsulated nanoparticle-based biosensor for the selective detection of cancer biomarkers. *Adv. Mater.* 23 (2011) 2221-2225.

N

[Nag et al., 2018] A. Nag, A. Mitra, S. C. Mukhopadhyay. Graphene and its sensor-based applications: A review. *Sens. Actuator A-Phys.* 270 (2018) 177-194.

[Nielsen, 2010] S. S. Nielsen. *Food analysis* (2010) Springer, New York pp.139-141.

[Nor et al., 2016] N. M. Nor, Z. Lockman, K. A. Razak. Study of ITO glass electrode modified with iron oxide nanoparticles and Nafion for glucose biosensor application. *Procedia Chem.* 19 (2016) 50- 56.

[Novoselov et al., 2004] K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, A. A. Firsov. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science* 306 (2004) 666-669.

O

[O'Meara & Wilkinson, 2019] E. O'Meara, M. G. Wilkinson. The use of flow-based technologies for food analysis. *Rapid antibody-based technologies. Food Analysis* (2019) 175-194.

[Oelofse et al., 2009] A. Oelofse, A. Lonvaud-Funel, M. Du Toit. Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production. *Food Microbiol.* 26 (2009) 377-385.

[Owens et al., 1978] J. L. Owens, H. A. Marsh Jr., G. Dryhurst. Electrochemical oxidation of uric acid and xanthine: An investigation by cyclic voltammetry, double potential step chronoamperometry and thin-layer spectroelectrochemistry. *J. Electroanal. Chem.* 91 (1978) 231-247.

[Ozoner et al., 2010] S. K. Ozoner, M. Yalvac, E. Erhan. Flow injection determination of catechol based on polypyrrole-carbon nanotube-tyrosinase biocomposite detector. *Curr. Appl. Phys.* 10 (2010) 323-328.

P

[Pakapongpan & Poo-arporn, 2017] S. Pakapongpan, R. P. Poo-arporn. Self-assembly of glucose oxidase on reduced graphene oxide-magnetic nanoparticles nanocomposite-based direct electrochemistry for reagentless glucose biosensor. *Mater. Sci. Eng. C* 76 (2017) 398-405.

- [Palanisamy et al., 2017] S. Palanisamy, S. K. Ramaraj, S. M. Chen, T. C. K. Yang, P. Yi-Fan, T.W. Chen, V. Velusamy, S. Selvam. A novel laccase biosensor based on laccase immobilized graphene-cellulose microfiber composite modified screen-printed carbon electrode for sensitive determination of catechol. *Sci. Rep.* 7 (2017) 41214.
- [Palanisamy et al., 2014] S. Palanisamy, C. Karuppiah, S. M Chen. Direct electrochemistry and electrocatalysis of glucose oxidase immobilized on reduced graphene oxide and silver nanoparticles nanocomposite modified electrode. *Colloids Surf., B* 114 (2014) 164–169.
- [Pingarrón et al., 2008] J. M. Pingarrón, P. Yañez-Sedeño, A. González-Cortés Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochim. Acta* 53 (2008) 5848-5866.
- [Pingarrón-Carrazón & Sánchez-Batanero, 1999] J. M. Pingarrón Carrazón, P. Sánchez Batanero. *Química electroanalítica: fundamentos y aplicaciones*. (1999). Síntesis, Madrid.
- [Portaccio et al., 2006] M. Portaccio, S. Di Martino, P. Maiuri, D. Durante, P. De Luca, M. Lepore, D. G. Mita. Biosensors for phenolic compounds: the catechol as a substrate model. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 41 (2006) 97-102.
- [Prosekov & Ivanova, 2018] A. Y. Prosekov, S. A. Ivanova. Food security: The challenge of the present. *Geoforum* 91 (2018) 73-77.
- [Pundir & Devi, 2014] C. S. Pundir, R. Devi. Biosensing methods for xanthine determination: a review. *Enzyme Microb. Technol.* 57 (2014) 55-62.

R

- [Rackus et al., 2015] D. G. Rackus, M. H. Shamsi, A. R. Wheeler. Electrochemistry, biosensors and microfluidics: a convergence of fields. *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 5320-5340.
- [Rasooly & Herold, 2008] A. Rasooly, K. E. Herold. Food microbial pathogen detection and analysis using DNA microarray technologies. *Foodborne Pathog. Dis.* 5 (2008) 531-550.
- [Raj & John, 2013] M. A. Raj, S. A. John. Simultaneous determination of uric acid, xanthine, hypoxanthine and caffeine in human blood serum and urine samples using electrochemically reduced graphene oxide modified electrode. *Anal. Chim. Acta* 771 (2013) 14-20.
- [Research and Markets, 2017] Research and Markets Nutritional analysis market by parameter, product type (beverages, bakery & confectionery, snacks, dairy & desserts, meat & poultry, sauces, dressings, condiments, fruits & vegetables, baby food), objective, and region - global forecast to 2022. (2017) Report ID. 4328048.
- [Research and Markets, 2018] Research and Markets Global nanotechnology market (by component and applications), funding and investment, patent analysis and 27 companies profile and recent developments-forecast to 2024. (2018) Report ID. 4520812.
- [Report Buyer, 2017] Report buyer global electrochemical biosensors market research report-forecast to 2022. (2017) Report ID: 5380745.

- [Rice-Evans et al., 1997] C. Rice-Evans, N. Miller, G. Paganga. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant. Sci.* 2 (1997) 152-159.
- [Riquelme et al., 2016] M. V. Riquelme, H. Zhao, V. Srinivasaraghavan, A. Pruden, P. Vikesland, M. Agah. Optimizing blocking of nonspecific bacterial attachment to impedimetric biosensors. *Sens. Bio.-Sens. Res.* 8 (2016) 47-54.
- [Robertson et al., 1991] M. L. Robertson, D. A. Eastmond, M. T. Smith. Two benzene metabolites, catechol and hydroquinone, produce a synergistic induction of micronuclei and toxicity in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res* 249 (1991). 201-209.
- [Roach et al., 2005] L. S. Roach, H. Song, R. F. Ismagilov. Controlling nonspecific protein adsorption in a plug-based microfluidic system by controlling interfacial chemistry using fluorosurfactants. *Anal. Chem.* 77 (2005) 785–796.
- [Rocha-Santos, 2014] T. A. Rocha-Santos. Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles. *Trends Anal. Chem.* 62 (2014) 28-36.
- [Romano et al., 2008] A. Romano, M. C. Perello, G. D. Revel, A. Lonvaud-Funel. Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. *J. Appl. Microbiol.* 104 (2008) 1577-1585.
- [Ronkainen et al., 2010] N. J. Ronkainen, H. B. Halsall, W. R. Heineman. Electrochemical biosensors. *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1747-1763.
- [Rotariu et al., 2016] L. Rotariu, F. Lagarde, N. Jaffrezic-Renault, C. Bala. Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants—trends and perspective. *Trends Anal. Chem.* 79 (2016) 80-87.

S

- [Saadaoui et al., 2016] M. Saadaoui, A. Sánchez, P. Díez, N. Raouafi, J. M. Pingarrón, R. Villalonga. Amperometric xanthine biosensors using glassy carbon electrodes modified with electrografted porous silica nanomaterials loaded with xanthine oxidase. *Microchim. Acta* 183 (2016) 2023-2030.
- [Sabury et al., 2015] S. Sabury, S. H. Kazemi, F. Sharif. Graphene-gold nanoparticle composite: application as a good scaffold for construction of glucose oxidase biosensor. *Mater. Sci. Eng. C* 49 (2015) 297-304.
- [Sanaeifar et al., 2017] N. Sanaeifar, M. Rabiee, M. Abdolrahim, M. Tahriri, D. Vashaei, L. Tayebi. A novel electrochemical biosensor based on Fe₃O₄ nanoparticles-polyvinyl alcohol composite for sensitive detection of glucose. *Anal. Biochem.* 519 (2017) 19-26.
- [Sánchez-Ferrer et al., 1995] A. Sánchez-Ferrer, J. N. Rodríguez-López, F. García-Cánovas, F. García-Carmona. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta -Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1247 (1995) 1-11.

- [Sasikumar et al., 2018] R. Sasikumar, V. Sethuraman, V. Sathish. Electrochemical sensor for catechol based on a polyaniline-tyrosinase recognition element. *J. Bionanosci.* 12 (2018) 772-779(8).
- [Segel, 1976] I. H. Segel. Biochemical calculations. 2nd Edition (1976) Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
- [Sekretaryova et al., 2016] A. N. Sekretaryova, M. Eriksson, A. P. Turner. Bioelectrocatalytic systems for health applications. *Biotechnol. Adv.* 34 (2016) 177-197.
- [Seo et al., 2003] S. Y. Seo, V. K. Sharma, N. Sharma. Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 2837-2853.
- [Shahrokhian and Salimian 2018] Shahrokhian, R. Salimian. Ultrasensitive detection of cancer biomarkers using conducting polymer/electrochemically reduced graphene oxide-based biosensor: application toward BRCA1 sensing. *Sens. Actuator B-Chem.* 266 (2018) 160-169.
- [Shan et al., 2003] D. Shan, S. Cosnier, C. Mousty. Layered double hydroxides: an attractive material for electrochemical biosensor design. *Anal. Chem.* 75 (2003) 3872-3879.
- [Shao et al., 2010] Y. Shao, J. Wang, H. Wu, J. Liu, I. A. Aksay, Y. Lin. Graphene based electrochemical sensors and biosensors: a review. *Electroanal.* 22 (2010) 1027-1036.
- [Sharma et al., 2015] V. Sharma, F. Jelen, L. Trnkova. Functionalized solid electrodes for electrochemical biosensing of purine nucleobases and their analogues: a review. *Sensors* 15 (2015) 1564-1600.
- [Shen et al., 2014] G. Shen, X. Hu, S. Zhang. A signal-enhanced electrochemical immunosensor based on dendrimer functionalized-graphene as a label for the detection of α -1-fetoprotein. *J. Electroanal. Chem.* 717-718 (2014) 172–176
- [Shi et al., 1999] H. Shi, W. B. Tsai, M. D. Garrison, S. Ferrari, B. D. Ratner. Template-imprinted nanostructured surfaces for protein recognition. *Nature* 398 (1999) 593-597.
- [Shuai et al., 2017] H. L. Shuai, K. J. W. Huang, J. Zhang, X. Cao, M. P. Jia. Sandwich -type micro RNA biosensor based on magnesium oxide nanoflower and graphene oxide–gold nanoparticles hybrids coupling with enzyme signal amplification. *Sens. Actuator B-Chem.* 243 (2017) 403–411.
- [Si et al., 2018] Y. Si, J. W. Park, S. Jung, G. S. Hwang, E. Goh, H. J. Lee. Layer-by-layer electrochemical biosensors configuring xanthine oxidase and carbon nanotubes/graphene complexes for hypoxanthine and uric acid in human serum solutions. *Biosens. Bioelectron.* 121 (2018) 265-271.
- [Singh et al., 2013] S. Singh, D. V. S. Jain, M. L. Singla. Sol-gel based composite of gold nanoparticles as matix for tyrosinase for amperometric catechol biosensor. *Sens. Actuator B-Chem.* 82 (2013) 161-169.

- [Singham et al., 2015] P. Singham, P. Birwal, B. K. Yadav. Importance of objective and subjective measurement of food quality and their inter-relationship. *J. Food Processing Technol.* 6 (2015) 1.
- [Song et al., 2016] Y. Song, Y. Luo, C. Zhu, H. Li, D. Du, Y. Lin. Recent advances in electrochemical biosensors based on graphene two-dimensional nanomaterials. *Biosens. Bioelectron.* 76 (2016) 195-212.
- [Schifferdecker et al., 2014] A. J. Schifferdecker, S. Dashko, O. P. Ishchuk, J. Piškur. The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. *Yeast* 31 (2014) 323-332.
- [Srivastava et al., 2014] S. Srivastava, M. A. Ali, S. Umrao, U. K. Parashar, A. Srivastava, G. Sumana, B. D. Malhotra, S. S. Pandey, S. Hayase. Graphene oxide-based biosensor for food toxin detection. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 174 (2014) 960-970.
- [Sroysee et al., 2016] W. Sroysee, K. Ponlakhet, S. Chairam, P. Jarujamrus, M. Amatatongchai. A sensitive and selective on-line amperometric sulfite biosensor using sulfite oxidase immobilized on a magnetite-gold-folate nanocomposite modified carbon-paste electrode. *Talanta* 156-157 (2016) 154-162.
- [Suárez et al., 2007] S. R. Suárez, J. A. Lepe, A. Morata, F. Calderón. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review. *Food Chem.* 102 (2007) 10–21.
- [Shukla et al., 2018] S. Shukla, Y. Haldorai, V. K. Bajpai, A. Rengaraj, S. K. Hwang, X. Song, M. Kim, Y. S. Huh, Y. K. Han. Electrochemical coupled immunosensing platform based on graphene oxide/gold nanocomposite for sensitive detection of *cronobacter sakazakii* in powdered infant formula. *Biosens. Bioelectron.* 109 (2018) 139–149.
- [Sulaiman et al., 2014] C. T. Sulaiman, J. Biju, G. Satheesh and V. K. Reddy. Total phenolics and flavonoids in selected medicinal plants from Kerala. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 6 (2014) 406-408.

T

- [Tahernejad-Javazmi et al., 2018] F. Tahernejad-Javazmi, M. Shabani-Nooshabadi, H. Karimi-Maleh. Gold nanoparticles and reduced graphene oxide-amplified label-free DNA biosensor for dasatiib detection. *New J. Chem.* 42 (2018) 16378-16383.
- [Taleat et al., 2014] Z. Taleat, C. Cristea, G. Marrazza, M. Mazloun-Ardakani, R. Săndulescu. Electrochemical immunoassay based on aptamer–protein interaction and functionalized polymer for cancer biomarker detection. *J. Electroanal. Chem.* 717-718 (2014) 119-124.
- [Thakoor et al., 2015] T. Terse-Thakoor, K. Komori, P. Ramnani, I. Lee, A. Mulchandani. Electrochemically functionalized seamless three-dimensional graphene-carbon nanotube hybrid for direct electron transfer of glucose oxidase and bioelectrocatalysis. *Langmuir* 31 (2015) 13054-13061.

- [Teng, et al., 2010] Y. J. Teng, C. Chen, C. X. Zhou, H. L. Zhao, M. B. Lan. Disposable amperometric biosensors based on xanthine oxidase immobilized in the Prussian blue modified screen-printed three-electrode system. *Sci. China Chem.* 53 (2010) 2581-2586.
- [Teymourian et al., 2013] H. Teymourian, A. Salimi, S. Khezrian. Fe₃O₄ magnetic nanoparticles/reduced graphene oxide nanosheets as a novel electrochemical and bioelectrochemical sensing platform. *Biosens. Bioelectron.* 49 (2013) 1-8.
- [Thandavan et al., 2013] K. Thandavan, S. Gandhi, S. Sethuraman. Development of electrochemical biosensor with nano-interface for xanthine sensing—a novel approach for fish freshness estimation. *Food Chem.* 139 (2013) 963-969.
- [Tiwari et al., 2015] I. Tiwari, M. Singh, C. M. Pandey, G. Sumana. Electrochemical detection of a pathogenic *Escherichia coli* specific DNA sequence based on a graphene oxide-chitosan composite decorated with nickel ferrite nanoparticles. *RSC Adv.* 5 (2015) 67115-67124.
- [Tkacz et al., 1971] J. S. Tkacz, E. B. Cybulska, J. O. Lampen. Specific staining of wallmannan in yeast cells with fluorescein-conjugated concanavalin A. *J. Bacteriol.* 105 (1971) 1-5.
- [Tofalo et al., 2015] R. Tofalo, M. Schirone, A. Corsetti, G. Suzzi. Detection of *Brettanomyces* spp. in red wines using real-time PCR. *J Food Sci.* 77 (2015) M545-M549.
- [Tymoczko et al., 2013] J. L. Tymoczko, J. M. Berg, L. Stryer. *Biochemistry: A Short Course*. 3rd Edt. (2013) p. 598 W. H. Freeman & Co Ltd.
- [Tran et al., 2014] H. V. Tran, B. Piro, S. Reisberg, L. Huy Nguyen, T. Dung Nguyen, H.T. Duc, M. C. Pham. An electrochemical ELISA-like immunosensor for miRNAs detection based on screen-printed gold electrodes modified with reduced graphene oxide and carbon nanotubes. *Biosens. Bioelectron.* 62 (2014) 25–30.
- [Tristezza et al., 2016] M. Tristezza, M. Tufariello, V. Capozzi, G. Spano, G. Mita, F. Grieco. The oenological potential of *Hanseniaspora uvarum* in simultaneous and sequential co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for industrial wine production. *Front. Microbiol.* 7 (2016) 670.
- [Tsuzuki, 2009] T. Tsuzuki. Commercial scale production of inorganic nanoparticles. *Int. J. Nanotechnol.* 6 (2009) 567-578.
- [Tukimin et al., 2017] N. Tukimin, J. Abdullah, Y. Sulaiman. Development of a PrGO-modified electrode for uric acid determination in the presence of ascorbic acid by an electrochemical technique. *Sensors* 17 (2017) 1539.
- [Tubía et al., 2018a] I. Tubía, J. Paredes, E. Pérez-Lorenzo, S. Arana. Antibody biosensors for spoilage yeast detection based on impedance spectroscopy. *Biosens. Bioelectron.* 102 (2018) 432-438.

[Tubia et al., 2018b] I. Tubia, J. Paredes, E. Pérez-Lorenzo, S. Arana. *Brettanomyces bruxellensis* growth detection using interdigitated microelectrode based sensors by means of impedance analysis. *Sens. Actuator A-Phys.* 269 (2018) 175-181.

[Tubia et al., 2018c] I. Tubia, K. Prasad, E. Pérez-Lorenzo, C. Abadín, M. Zumárraga, I. Oyanguren, F. Barbero, J. Paredes, S. Arana. Beverage spoilage yeast detection methods and control technologies: A review of *Brettanomyces*. *Int. J. Food Microbiol.* 283 (2018) 65-76.

V

[Vaghari et al., 2016] H. Vaghari, H. Jafarizadeh-Malmiri, M. Mohammadlou, A. Berenjian, N. Anarjan, N. Jafari, S. Nasiri. Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. *Biotechnol. Lett.* 38 (2016) 223-233.

[Vicentin et al., 2013] F. C. Vicentini, B. C. Janegitz, C. M. A. Brett, O. Fatibello-Filho. Tyrosinase biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and 1-butyl-3-methylimidazolium chloride within a dihexadecylphosphate film. *Sens. Actuator B-Chem.* 188 (2013) 1101–1108.

[Versavaud et al., 1995] A. Versavaud, P. Courcoux, C. Roulland, L. Dulau, J. N. Hallet. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes. France. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 3521-3529.

[Vilela et al., 2015] E. T. Vilela, R.D.C.S. Carvalho, S. Y. Neto, R.D.C.S. Luz, F.S. Damos. Exploiting charge/ions compensating processes in PANI/SPANI/reduced graphene oxide composite for development of a high sensitive H₂O₂ sensor. *J. Electroanal. Chem.* 752 (2015) 75-81.

[Vigneshvar et al., 2016] S. Vigneshvar, C. C. Sudhakumari, B. Senthilkumaran, H. Prakash. Recent advances in biosensor technology for potential applications- an overview. *Front. Bioeng. Biotech.* 4 (2016) 11.

[Villalonga et al., 1999] R. Villalonga, L. Gómez, H. L. Ramírez, M. L. Villalonga. Stabilization of α -amylase by chemical modification with carboxymethylcellulose. *J Chem Technol Biotechnol.* 74 (1999) 635-638.

[Villalonga et al., 2000] R. Villalonga, M. L. Villalonga, L. Gómez. Preparation and functional properties of trypsin modified by carboxymethylcellulose. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 10 (2000) 483-490.

[Villalonga et al., 2003] M. L. Villalonga, M. Fernández, A. Fragoso, R. Cao, R. Villalonga. Functional stabilization of trypsin by conjugation with β -cyclodextrin-modified carboxymethylcellulose. *Prep. Biochem. Biotech.* 33 (2003) 53-66.

[Villalonga et al., 2012] R. Villalonga, P. Díez, M. Eguílaz, P. Martínez, J. M. Pingarrón. Supramolecular immobilization of xanthine oxidase on electropolymerized matrix of

functionalized hybrid gold nanoparticles/single-walled carbon nanotubes for the preparation of electrochemical biosensors. *ACS Appl. Mat. Interfaces* 4 (2012) 4312-4319.

[Villalonga et al., 2014] M. L. Villalonga, P. Diez, A. Sánchez, M. Gamella, J. M. Pingarrón, R. Villalonga. Neoglycoenzymes. *Chem. Rev.* 114 (2014) 4868-4917.

[Villalonga et al., 2019] M. L. Villalonga, B. Borisova, C. B. Arenas, A. Villalonga, M. Arévalo-Villena, A. Sánchez, J. M. Pingarrón, A. Briones-Pérez, R. Villalonga. Disposable electrochemical biosensors for *Brettanomyces bruxellensis* and total yeast content in wine based on core-shell magnetic nanoparticles. *Sens. Actuator B-Chem.* 279 (2019) 15-21

[Vögtle et al., 2009] F. Vögtle, G. Richardt, N. Werner. *Dendrimer chemistry: concepts, syntheses, properties, applications.* (2009). John Wiley & Sons.

[Vusa et al., 2016] R. Vusa, V. Manju, S. Berchmans, P. Arumugam. Electrochemical amination of graphene using nanosized PAMAM dendrimers for sensing applications. *RSC Adv.* 40 (2016) 33409-33418.

W

[Wang et al., 2010] Z. Wang, F. A. Xu, Q. Yang, J. H. Yu, W. H. Huang, Y. D. Zhao. Electrocatalytic activity of salicylic acid on the platinum nanoparticles modified electrode by electrochemical deposition. *Colloid Surf. B* 76 (2010) 370-374.

[Wang et al., 2011] Y. Wang, Z. Li, J. Wang, J. Li, Y. Lin. Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 29 (2011) 205-212.

[Wang et al., 2014] L. Wang, E. Hua, M. Liang, C. Ma, Z. Liu, S. Sheng. Graphene sheets, polyaniline and AuNPs based DNA sensor for electrochemical determination of BCR/ABL fusion gene with functional hairpin probe. *Biosens. Bioelectron.* 51 (2014) 201-207

[Wang et al., 2015] J. Wang, B. Yang, H. Wang, P. Yang, Y. Du. Highly sensitive electrochemical determination of sunset yellow based on gold nanoparticles/graphene electrode. *Anal. Chim. Acta* 893 (2015) 41-48.

[Wang & Dai, 2015] Z. Wang, Z. Dai. Carbon nanomaterial-based electrochemical biosensors: an overview. *Nanoscale* 7 (2015) 6420-6431.

[Wedral et al., 2010] D. Wedral, R. Shewfelt, J. Frank. The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT Food Sci. Technol.* 43 (2010) 1474-1479.

[Wei et al., 2019] J. Wei, Y. Zhang, Y. Yuan, L. Dai, T. Yue. Characteristic fruit wine production via reciprocal selection of juice and non-*Saccharomyces* species. *Food Microbial.* 79 (2019) 66-74.

[Wei & Wang, 2008] H. Wei, E. Wang. Fe₃O₄ magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics and their applications in H₂O₂ and glucose detection. *Anal. Chem.* 80 (2008) 2250-2254.

[Wen et al., 2017] Y. Wen, J. Chang, L. Xu. Simultaneous voltammetric analysis of uric acid, xanthine and hypoxanthine using nanocomposite sensor based on carboxymethyl cellulose decorated both palygorskite and nitrogen doped graphene. *J. Electroanal. Chem.* 805 (2017) 157-170.

[Wongkaew et al., 2018] N. Wongkaew, M. Simsek, C. Griesche, A. J. Baeumner. Functional nanomaterials and nanostructures enhancing electrochemical biosensors and lab-on-a-chip performances: recent progress, applications, and future perspective. *Chem. Rev.* 119 (2018) 120-194.

[Wu et al., 2019] L. Wu, G. Li, X. Xu, L. Zhu, R. Huang and X. Chen. Application of nano-ELISA in food analysis: recent advances and challenges. *Trends Anal. Chem.* 113 (2019) 140-156.

X

[Xiao et al., 2016] D. Xiao, T. Lu, R. Zeng, Y. Bi. Preparation and highlighted applications of magnetic microparticles and nanoparticles: a review on recent advances. *Microchim. Acta* 183 (2016) 2655-2675.

[Xu et al., 2014] K. Xu, X. Meshik, B. M. Nichols, E. Zakar, M. Dutta, M.A. Strosio. Graphene- and aptamer-based electrochemical biosensor. *Nanotechnology* 25 (2014) 205501.

[Xu et al., 2017] S. Xu, Y. Zhang, K. Dong, J. Wen, C. Zheng, S. Zhao. Electrochemical DNA biosensor based on graphene oxide-chitosan hybrid nanocomposites for detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Electrochem. Sci.* 12 (2017) 3443-3458.

Y

[Yang et al., 2014] X. Yang, F. Wu, D.Z. Chen, H.W. Lin. An electrochemical immunosensor for rapid determination of clenbuterol by using magnetic nanocomposites to modify screen printed carbon electrode based on competitive immunoassay mode. *Sens. Actuator B-Chem.* 192 (2014) 529-535.

[Yáñez-Sedeño et al., 2015] P. Yáñez-Sedeño, R. Villalonga, J. M. Pingarrón, Electroanalytical Methods Based on Hybrid Nanomaterials. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation* (2015) 1-18.

[Yasmin et al., 2016] J. Yasmin, M. R. Ahmed, B. K. Cho. Biosensors and their applications in food safety: a review. *Biosyst. Eng.* 41 (2016) 240-254.

[Yu et al., 2014] Y. Yu, Z. Chen, S. He, B. Zhang, X. Li, M. Yao. Direct electron transfer of glucose oxidase and biosensing for glucose based on PDDA-capped gold nanoparticle modified graphene/multi-walled carbon nanotubes electrode. *Biosens. Bioelectron.* 52 (2014) 147-152.

Z

- [Zhang et al., 2014] Y. Zhang, S. Xiao, J. Xie, Z. Yang, P. Pang, Y. Gao. Simultaneous electrochemical determination of catechol and hydroquinone based on graphene-TiO₂ nanocomposite modified glassy carbon electrode. *Sens. Actuator B-Chem.* 204 (2014) 102-108.
- [Zhang et al., 2015] W. Zhang, X. Li, R. Zou, H. Wu, H. Shi, S.Yu, Y.Liu. Multifunctional glucose biosensors from Fe₃O₄ nanoparticles modified chitosan/graphene nanocomposites. *Sci. Rep.* 5 (2015) 11129.
- [Zhao et al., 2015] H. Zhao, X. Ji, B. Wang, N. Wang, X. Li, R. Ni, J. Ren. An ultra-sensitive acetylcholinesterase biosensor based on reduced graphene oxide-Au nanoparticles-β-cyclodextrin/Prussian blue-chitosan nanocomposites for organophosphorus pesticides detection. *Biosens. Bioelectron.* 65 (2015) 23–30.
- [Zhang & Heller, 2005] Y. Zhang, A. Heller. Reduction of the nonspecific binding of a target antibody and of its enzyme-labeled detection probe enabling electrochemical immunoassay of an antibody through the 7 pg/mL–100 ng/mL (40 fM–400 pM) Range. *Anal. Chem.* 77 (2005) 7758-7762.
- [Zhao et al., 2017] F. Zhao, L. Cao, Y. Liang, Z. Wu, C. Zhencheng, R. Zeng. Label-free amperometric immunosensor based on graphene oxide and ferrocene-chitosan nanocomposites for detection of hepatitis B virus antigen. *J. Biomed. Nanotechnol.* 13 (2017) 1300-1308.
- [Zhou et al., 2014] L. Zhou, J. Wang, D. Li, Y. Li. An electrochemical aptasensor based on gold nanoparticles dotted graphene modified glassy carbon electrode for label-free detection of bisphenol A in milk samples. *Food Chem.* 162 (2014) 34-40.
- [Zhu et al., 2019] J. Zhu, Z. Ye, X. Fan, H. Wang, Z. Wang, B. Chen. A highly sensitive biosensor based on Au NPs/rGO-PAMAM-Fc nanomaterials for detection of cholesterol. *Int. J. Nanomedicine* 14 (2019) 835–849.
- [Zikakis & Silver, 1984] J. P. Zikakis, M. R. Silver. Bovine milk xanthine oxidase: effect of limited proteolysis on kinetics and structure. *J. Agric. Food Chem.* 32 (1984) 340-343.
- [Zion Market Research, 2017] Zion Market Research Nanomaterials market (metal oxide, metals, chemicals & polymers and others) for construction, chemical products, packaging, consumer goods, electrical and electronics, energy, health care, transportation and other applications: global market perspective, comprehensive analysis and forecast (2017) 2016-2022. Report ID. ZMR-1979.

